

**Über die elektrophysiologische Untersuchung und
Entwicklung von farbverschobenen
Kanalrhodopsinchimären aus der Grünalge *Volvox carteri***

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. rer. nat.
im Fach Biophysik

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I
Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom Biochemiker Matthias Prigge

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin:
Prof. Dr. Jan-Hendrik Oltertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I:
Prof. Dr. Andreas Hermann

Gutachter:

1. Prof. Dr. Peter Hegemann
2. Prof. Dr. Thomas Friedrich
3. PD Dr. Franz Bartl

eingereicht am: 02.02.2012

Tag der mündlichen Prüfung: 24.5.2012

„Ich bin nicht Stiller“

Max Frisch aus dem Roman „Stiller“

*Ich widme diese Arbeit
aus offensichtlichen Gründen,
meinem Chef, Prof. Peter Hegemann.*

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits vorab veröffentlicht:

F. Zhang, **M. Prigge**, F. Beyriere, S. P. Tsunoda, J. Mattis and O. Yizhar, P. Hegemann und K. Deisseroth. Red-shifted optogenetic excitation: a tool for fast neural control derived from *Volvox carteri*., *Nature Neuroscience*, Vol(11), S. 631 ff., 2008

M. Prigge, A. Rösler und P. Hegemann, Fast, repetitive light-activation of $Ca_v3.2$ using channelrhodopsin 2., *Channels*, Vol(4), S. 241 ff., 2010

A. Berndt*,**M. Prigge***, D. Gradmann und P. Hegemann, Two open states with progressive proton selectivities in the branched channelrhodopsin-2 photocycle., *Biophysical Journal*, Vol(98), S. 753 ff., 2010

O. Yizhar, L. E. Fenno, **M. Prigge**, F. Schneider, T. J. Davidson, D. J. O'Shea, V. S. Sohal, I. Goshen, J. Finkelstein, J. T. Paz, K. Stehfest, R. Fudim, C. Ramakrishnan, J. R. Huguenard, P. Hegemann und K. Deisseroth, Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction., *Nature*, Vol (477), S. 171 ff., 2011

F. Zhang, J. Vierock, O. Yizhar, L. E. Fenno, S. P. Tsunoda, A. Kianianmomeni, **M. Prigge**, A. Berndt, J. Cushman, J. Polle, Jon Magnuson, P. Hegemann und K. Deisseroth, The microbial opsin family of optogenetic tools., *Cell*, Vol(147), S. 1446 ff., 2011

Abstract

The discovery of the channelrhodopsins (ChRs), C1 and C2 from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* 10 years ago, created the new protein family of light-gated ion channels. Those 7-Transmembranproteins are utilizing *all-trans* retinal to absorb light at specific wavelength. Upon light absorption the retinal isomerizes which leads to opening of a protein pore allowing ions such as H^+ , Na^+ and Ca^{2+} to pass the membrane depending on their electrochemical gradient. In the last years C2 attracted a lot of attention in neuroscience since its expression in neurons allows to control their electrical properties with short light pulses. This work presents the electrophysiological characterization of two new ChRs V1 and V2 from the multicellular alga *Volvox carteri* for the first time. V2 absorbs light in the blue visible range like C2 and almost identical kinetic properties. In contrast, V1 exhibit a 70 nm redshifted absorption towards 535 nm and a ~ 10 x slower off-kinetic than C2. Since V1 displays only weak membrane targeting the resulting overall small photocurrent in eukaryotic cells significantly hampered its application in neuronal cells. To improve membrane targeting and to retain redshifted absorbance helices from V1 were exchanged with the corresponding helices from the other ChRs. A chimera called C1V1-25, which consists out of the first 2 helices from C1 and the last 5 helices from V1 showed a absorbance maximum at 539 nm and exhibit a 4 times higher photocurrent even being 2 times higher then the one of C2. In a subsequent mutational analysis two amino acids were identified, G220 and E122 whose mutation to Gly and Thr result in a shifted absorption maxima at 520 and 550 nm, respectively. Additional mutations on these two color variants were used to fine tune off-kinetics and generate variant with increased or decreased off-kinetics. Due to the enlarged pallet of different ChRs variants it was possible to develop a test-system in which cellular activity could be now modulated with green and yellow absorbing ChRs and where cellular activity could be monitored with blue fluorescence genetically-encode calcium indicators.

Zusammenfassung

Die Entdeckung der Kanalrhodopsine (ChRs) C1 und C2 aus der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* vor 10 Jahren brachte die neue Proteinfamilie der lichtgesteuerten Ionenkanäle hervor. Diese 7-Transmembranproteine verwenden *all-trans* Retinal, um Licht einer bestimmten Wellenlänge zu absorbieren. Bei Lichtabsorption isomerisiert das Retinal und das Protein öffnet daraufhin seine Pore, die es Ionen wie H^+ , Na^+ und Ca^{2+} erlaubt, abhängig von ihrem elektrochemischen Gradienten, die Membran zu passieren. Insbesondere in der Neurophysiologie findet seit kurzem das C2 eine breite Anwendung, da seine Expression in Nervenzellen es erlaubt, mittels kurzer Lichtpulse die elektrische Aktivität dieser Zellen zu kontrollieren. In dieser Arbeit wurden zum ersten Mal die beiden neuen ChRs V1 und V2 aus der mehrzelligen Grünalge *Volvox carteri* elektrophysiologisch charakterisiert. Hierbei zeigte sich, dass V2, ähnlich wie C2, im blauen Spektralbereich absorbiert und auch, dass sich die kinetischen Eigenschaften stark ähneln. Dagegen besitzt V1 eine um 70 nm längerwellig verschobene Absorption auf 535 nm bei einer ~ 10 x langsameren Abklingkinetik als C2. Durch die schlechte Membranintegration von V1 in eukaryotischen Zellen ist der Photostrom gering und die Anwendungen in Neuronen stark eingeschränkt. Um die Membranintegration zu verbessern, wurden einzelne Helices von V1 gegen die entsprechenden Helices der anderen ChRs ausgetauscht. Hierbei wurde eine Chimäre C1V1-25, die aus den ersten 2 Helices von C1 und den restlichen 5 Helices von V1 besteht, entwickelt. Die Chimäre besitzt weiterhin eine rotverschobene Absorption bei 539 nm, einen 4 x höheren Photostrom als V1 und der doppelt so hoch ist wie der von C2. In einer anschließenden Mutationsstudie wurden unter anderem die beiden Aminosäuren S220 und E122 identifiziert, deren Mutation zu Gly und im anderen Fall zu Thr zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximum auf 520 beziehungsweise 550 nm verschiebt. Zusätzliche Mutationen in diesen beiden neuen Farbvarianten generierten weitere Formen mit beschleunigter und verlangsamter Abklingkinetik. Durch die neue spektrale Vielfalt an ChRs konnte ein Testsystem entwickelt werden, in dem die Zellen über die neuen Varianten mittels grünem und gelbem Licht stimuliert wurden. Die veränderte Zellaktivität konnte mittels blauen genetisch-kodierten fluoreszierenden Kalziumindikatoren optisch detektiert werden.

Verzeichnis verwendeter Abkürzungen

AM	Azetomethylester
AP	Aktionspotential
As	Aminosäure
ASR1	Anabaena Sensorrhodopsin-1 aus <i>Anabaena Sp. Pcc7120</i>
Arch3	Archaeorhodopsin-3 aus <i>Halorubrum sodomense</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BE	Badelektrode
BP	Bandpass
BR	Bakteriorhodopsin aus <i>Halobacterium salinarum</i>
C1	Kanalrhodopsin 1 aus <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
C2	Kanalrhodopsin 2 aus <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CC	Strom-geklemmter Modus (Current Clamp)
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
ChETA	<i>ChR ET</i> Austausch
ChRs	Kanalrhodopsine
ChRs*	angeregte ChRs
D470	dunkeladaptiertes 470 nm absorbierendes Photointermediat
D500	dunkeladaptiertes 500 nm absorbierendes Photointermediat
D540	dunkeladaptiertes 540 nm absorbierendes Photointermediat
Des480	desensibilisiertes 480 nm absorbierendes Photointermediat
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbeccos minimales essentielles Medium
DMSO	Dimethylsulfonoxid
<i>ddH₂O</i>	doppelt destilliertes, autoklaviertes Wasser x
D/A	Digital / Analog Wandler
EKG	Elektrokardiogramm
FT	Farbteiler

FKS	fetales Kälberserum
fP	fluoreszierendes Protein
FRET	Förster Resonanz Energie Transfer
F-Strom	Flagellenstrom in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
Fura-2	kalziumsensitiver Fluoreszenzfarbstoff
GfP	grün fluoreszierendes Protein
GCl	Guanidinchlorid
GTP	Guanosintriphosphat
HR	Halorhodopsin aus <i>Halobacterium salinarum</i>
iGluR6	ionotroper Glutamatrezeptor aus der Kainat-Familie
LB	Lysogene Brühe (lysogeny broth)
LED	lichtemittierenden Diode
LFP	lokale Feldpotentialmessung
MAC	Protonenpumpe aus <i>Leptosphaeria maculans</i>
MAG	Malemid-Azobenzen-Glutamat
mRNS	Boten Ribonukleinsäure
NA	numerische Apertur
NCBI	National Center for Biological Information
NMG	N-Metyl Glucamin
OPO	optisch parametrischer Oszillator
P390	photoaktivierte 390 nm absorbierendes Intermediat
P480	photoaktivierte 480 nm absorbierendes Intermediat
P500	photoaktivierte 500 nm absorbierendes Intermediat
P520	photoaktivierte 520 nm absorbierendes Intermediat
P600	photoaktivierte 600 nm absorbierendes Intermediat
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
P-Strom	Photostrom in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDB	Protein Data Bank
REN	Restriktionsendonuklease
Rh	Vertebraten Rhodopsin
ROI	Bezugsfläche (region of interest) ^{vi}
RGC	Retinal Ganglion Zellen
RP	Retinitis pigmentosa

<i>RSB</i>	deprotonierte retinale Schiffsche Base
<i>RSBH</i> ⁺	protonierte retinale Schiffsche Base
SFR	Step Function Rhodopsine
ST	Strahlenteiler
SSFR	Slow Step Function Rhodopsine
SRI	Sensorrhodopsin I aus <i>Halobacterium salinarum</i>
SRII	Sensorrhodopsin II aus <i>Halobacterium salinarum</i>
TTL	Transistor-Transistor Logik
V1	<i>Volvox carteri</i> Kanalrhodopsin 1
V2	<i>Volvox carteri</i> Kanalrhodopsin 2
VC	spannungsgeklemmter Modus (Voltage Clamp)
<i>wt</i>	Wildtyp
XBO	Xenon-Gasentladungslampe
λ_{max}	Wellenlänge der maximalen Aktivität

Aminosäuren werden bei Mutationen mit dem Einbuchstabencode abgekürzt und im Text mit den Dreibuchstabencode.

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis verwendeter Abkürzungen	ix
1 Einleitung	1
1.1 Sehen mit einem oder tausend Augen: Die Grünalgen <i>C. reinhardtii</i> und <i>V. carteri</i>	2
1.1.1 Taxonomie	2
1.1.2 Morphologie	2
1.1.3 Aufbau und Funktionsweise des Augenfleckes	4
1.2 Kanalrhodopsine	5
1.2.1 Einteilung	5
1.2.2 Molekularer Aufbau	7
1.2.3 Eigenschaften von Kanalrhodopsinen	9
1.3 Kanalrhodopsine in der Optogenetik	17
1.3.1 Was ist Optogenetik?	17
1.3.2 Anwendungen des Kanalrhodopsins in der Optogenetik	20
1.4 Bekannte anwendungsbezogene Optimierungen von Kanalrhodopsinen . .	26
1.4.1 Kinetische Veränderungen	26
1.4.2 Spektrale Veränderungen	28
1.4.3 Chimäre Kanalrhodopsine	29
2 Zielstellung	31
3 Material und Methoden	33

3.1	Molekularbiologie	33
3.1.1	Polymerase-Kettenreaktion	33
3.1.2	Restriktionsverdau der DNS	34
3.1.3	Ligation der DNS	34
3.1.4	Plasmid-Transformation	35
3.1.5	Aufreinigung der DNS	35
3.1.6	Ortsspezifische Mutagenese	35
3.1.7	Sequenzierung der DNS	36
3.1.8	Verwendete Konstrukte für HEK Zellen	36
3.2	Etablierung von zellkulturbezogenen Arbeitstechniken	38
3.2.1	Kultivierung von HEK Zellen	39
3.2.2	Transfektion von HEK Zellen	40
3.2.3	Vorbereiten der Zellen zur zeitaufgelösten Fluoreszenzmessung . .	41
3.2.4	Verwendete eukaryotische Zelllinien	41
3.3	Elektrophysiologische Messungen	42
3.3.1	Messungen mit Saugelektroden an <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> . .	43
3.3.2	Zwei-Elektrodenmessungen an <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	43
3.3.3	Patch-Clamp Messungen an HEK Zellen	45
3.4	Fluoreszenzmessungen	58
3.4.1	Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung	58
3.4.2	Konfokale Mikroskopie	59
3.5	Datenanalyse und Auswertung	60
4	Ergebnisse	65
4.1	Saugelektrodenmessungen an <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	65
4.2	Elektrische Messungen an Kanalrhodopsinen in eukaryotischen Zellen . .	67
4.2.1	Elektrophysiologische Charakterisierung des Kanalrhodopsin-2 von <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	67
4.2.2	Erstmalige elektrophysiologische Charakterisierung der Kanalrhodopsine 1 und 2 aus <i>Volvox carteri</i>	70

4.3	Farbverschiebung von Kanalrhodopsinen	75
4.3.1	Design und Charakterisierung von Kanalrhodopsinchimären . . .	76
4.3.2	Charakterisierung vom C1V1-25	79
4.3.3	Mutationsstudien an der Kanalrhodopsinchimäre C1V1-25	81
4.4	Kanalrhodopsine in Kombination mit Kalziumsensoren	94
4.4.1	Zeitaufgelösten Fluoreszenzmessung von Kanalrhodopsin mit Fura-2	94
4.4.2	Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung mit Kanalrhodopsin und genetisch-kodierten Kalziumsensoren	97
5	Diskussion	101
5.1	Messungen an <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	101
5.2	Die Kristallstruktur der Kanalrhodopsinchimäre C1C2-52	102
5.3	Etablierung der Patch-Clamp Methode und Charakterisierung von <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Kanalrhodopsin 2	105
5.4	Charakterisierung von <i>Volvox carteri</i> Kanalrhodopsinen	109
5.5	Design der Kanalrhodopsinchimäre C1V1-25	113
5.6	Anwendungsbezogene Optimierung der Kanalrhodopsin Variante C1V1-25	117
5.7	Lichtabhängige Aktivierung und Detektion von Kalziumeinströmen	122
6	Anhang	125
A	Anhang	126
	Literaturverzeichnis	131
	Danksagung	151

1 Einleitung

Der Mensch erschafft sich seine Welt aus der sinnlichen Wahrnehmung: Hören, Riechen, Schmecken, Tasten und Sehen. Die Außenwelt besteht für ihn aus Reizen, die er nur über ausgefeilte biophysikalische Sensoren wahrnehmen kann. Der jeweilige Sensor ist dabei für eine Art von Stimulus spezifisch; die Anteile des jeweiligen Sensors zur Gesamtkonstitution der Außenwelt sind aber nicht gleich verteilt – allein das Sehen macht 70 - 80% aus [1].

Für das Sehen verwendet die einzelne Zelle einen sogenannten Photorezeptor als Sensor. Diese Rezeptoren bestehen in der Regel aus einem lichtsensitiven Sensormodul und einem katalytischen Reaktionsmodul [2]. Da Aminosäuren (As) nur kurzwelliges UV-Licht $\leq 300 \text{ nm}$ absorbieren, verwenden Photorezeptoren spezielle Moleküle, um auch längerwelliges, sichtbares Licht zu absorbieren. Diese Moleküle werden als Chromophore bezeichnet und besitzen ein System von delokalisierten Elektronen. Diese Elektronen werden bereits bei kleineren Lichtenergien in einen angeregten Zustand überführt. Dabei legt die Energiedifferenz zwischen Grund- und angeregtem Zustand fest, welche Farbe des Lichtes absorbiert wird und liegt für die meisten biologischen Chromophore im sichtbaren Bereich von $400 - 700 \text{ nm}$ [3]. Photorezeptoren werden unter anderen nach Art ihrer Chromophore eingeteilt:

Der angeregte Chromophor initiiert zuerst eine lokale Konformationsänderung im Sensormodul des Photorezeptors, die dann auf das Reaktionsmodul weiter übertragen wird. Das so aktivierte Reaktionsmodul kann dann wiederum verschiedenste biochemische Kaskaden initiieren. Beispielsweise beginnt im menschlichen Auge mit der

Flavoproteine	FMN, FAD	350 – 500 nm
Xanthopsine	Cumarinsäure	400 – 540 nm
Rhodopsine	Retinal	380 – 590 nm
Phytochrome	Tetrapyrole	400 – 500 nm/620 - 680 nm

Tabelle 1.1: Einteilung der Photorezeptoren nach ihren Chromophoren. Andere Proteine benutzen die aufgeführten Chromophore auch als Ko-Faktor zum Katalysieren von nicht lichtabhängigen Reaktionen. Einteilung nach *R.Briggs* und *J.L.Spudich* [4].

Lichtabsorption durch das Rhodopsin eine komplexe Kaskade, die über 4 weitere Proteine schlussendlich zum Verändern der Membranspannung führt [5].

Die einzellige Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* und die mehrzellige Grünalge *Volvox carteri* nehmen auch ihre Umwelt war um optimale Belichtungsbedingungen für die Photosynthese zu finden. Hierfür verwenden sie aber ein kompakteres System, nämlich Photorezeptoren die Belichtungsänderungen direkt in Änderungen der Membranspannung transformiert: Die Kanalrhodopsine (ChR).

1.1 Sehen mit einem oder tausend Augen: Die Grünalgen

C. reinhardtii und *V.carteri*

1.1.1 Taxonomie

Die *Chloroplastida* sind eine Gruppe von photosynthetisch aktiven *Eukaryoten*, die Plastide mit Chlorophyll a und b besitzen. Zu ihnen gehören die Grünalgen und die Pflanzen. Die beiden Grünalgen *C. reinhardtii* und *V. carteri* fallen beide in die Ordnung der *Volvocales* und somit in die Klasse der *Chlorophyceae*. Auf der Ebene der Familien gehört *C. reinhardtii* zu den *Chlamydomonadaceae* und *V. carteri* zu den *Volvocaceae*.

1.1.2 Morphologie

Chlamydomonas reinhardtii

C. reinhardtii hat eine leicht ovale Form mit einer Ausdehnung von 10 – 15 μm . Am anterioren Pol entspringen zwei gleichlange Geißeln. Ungefähr 10 μm von den Geißeln

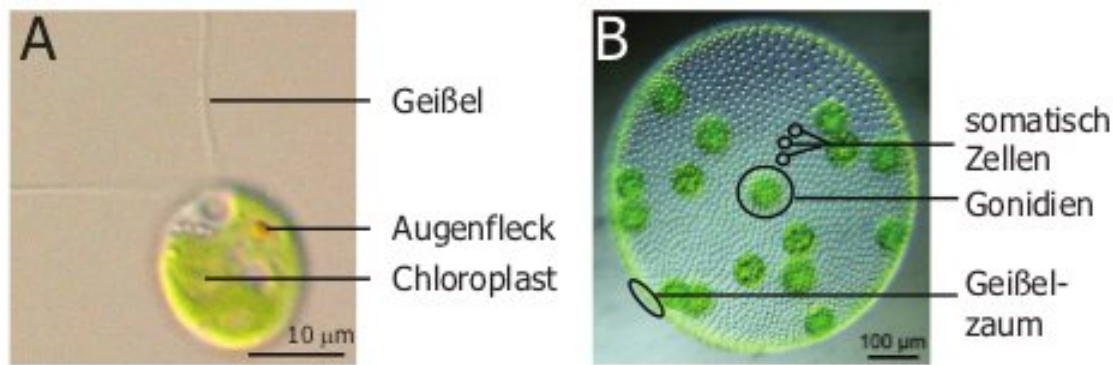


Abbildung 1.1: Mikroskopische Aufnahmen der beiden Süßwasseralgen *C. reinhardtii* und *V. carteri*. In **A** sind die Geißeln, der Chloroplast und die ungefähre Position des Augenflecks von *C. reinhardtii* gezeigt (Foto von G. Kreimer). Die Gestalt der somatischen Zellen von *V. carteri* (**B**) ähneln jener von *C. reinhardtii*. Neben den somatischen Zellen sind in **B** auch die Gonidien und der Geißelzaum markiert. Der gesamte Zellverband wird als Spheroid bezeichnet und ist in einer extrazellulären Matrix eingebettet (Foto von A. Hallmann) [6].

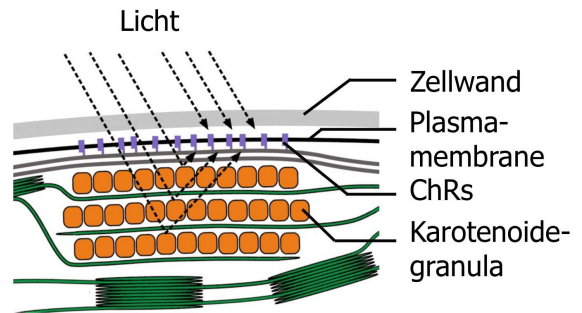
entfernt liegt der $\sim 1 \mu\text{m}^2$ große Augenfleck. Er dient als Detektor um Richtung und Intensität des Lichtes zu bewerten [7]. Zweidrittel des Zellvolumens werden durch einen bohnenförmigen Riesenchloroplasten eingenommen (siehe Abbildung 1.1 **A**) [8].

Volvox carteri

Volvox bildet eine kugelförmige Kolonie mit einem Durchmesser von 0.15 - 1 mm. Die Kolonie besteht aus 2 verschiedenen Zelltypen. Die kleineren somatischen Zellen ähneln *C. reinhardtii* und befinden sich am äußeren Rand der Kolonie. Ihre beiden Geißeln ragen dabei aus der Kolonie hervor. Um die Kolonie in eine Richtung zu bewegen, besitzen die somatischen Zellen am anterioren Pol der Kolonie einen größeren Augenfleck als Zellen am posterioren Pol. Diese Zellen sind somit lichtsensitiver und ihr Geißelschlag übertrifft den der anderen Zellen, wodurch sich die Kolonie in eine Richtung bewegt [9, 10]. Die somatischen Zellen produzieren auch die extrazelluläre Matrix, in die alle Zellen eingebettet sind.

Im Inneren der Kolonie befinden sich die 16 größeren, geißellosen Gonidien, die für die Vermehrung verantwortlich sind (siehe Abbildung 1.1 **B**). Die beiden Zelltypen in der Kolonie erfüllen somit unterschiedliche Funktionen und markieren den evolutionären

Abbildung 1.2: Zeigt schematisch den komplexen Aufbau des Augenfleckes. Die Karotinoidschichten liegen $\sim 125\text{ nm}$ auseinander und bewirken bei einem bestimmten Einfallswinkel eine konstruktive Interferenz für Licht einer Wellenlänge um $\sim 500\text{ nm}$ [13].



Übergang vom Einzeller zum Mehrzeller.

1.1.3 Aufbau und Funktionsweise des Augenfleckes

Die Architektur des Augenfleckes von *C. reinhardtii* und von *V. carteri* ist nahezu identisch [11]. Der Augenfleck besteht aus mehreren parallel zur Zelloberfläche angeordneten Schichten aus karotenoidhaltigen Lipidgranula. Diese Schichten besitzen einen hohen Brechungsindex ($n \sim 1.9$) und sind im Abstand von 125 nm durch Schichten mit geringerem Brechungsindex getrennt ($n \sim 1.35$) [12]. Senkrecht einfallendes Licht wird durch diese unterschiedlichen Brechungsindizes sowohl reflektiert und transmittiert. Abhängig vom Einfallswinkel und Wellenlänge wird Licht konstruktiv oder destruktiv verstärkt beziehungsweise abgeschwächt. Bei einer Wellenlänge die 4 x größer ist als der Abstand der Karotenoide-schichten zueinander, ist die Verstärkung von senkrecht einfallendem Licht am größten [8, 12]. Durch diesen Interferenzspiegel wird die Spannbreite der Lichtintensitäten zwischen der kleinsten Intensität, wenn der Augenfleck von der Lichtquelle abgewandt ist, und der größten, wenn er ihr zugewandt ist, um den Faktor 8 erweitert [7]. Die so gedehnte Lichtskala erlaubt phototaktischen Grünalgen auf kleinste Lichtänderungen zu reagieren. Damit dieser molekulare Interferenzspiegel funktioniert, müssen die ChRs genau über dem Reflektor positioniert werden. Es wird vermutet, dass der methionin- und glyzinreiche C-Terminus der ChRs mit der Karotenoide-schicht oder äußeren Chloroplastenmembran interagiert und dafür sorgt, dass die ChRs genau über den Reflektor ausgerichtet sind (siehe Abbildung 5.3) [13].

1.2 Kanalarhodopsine

1.2.1 Einteilung

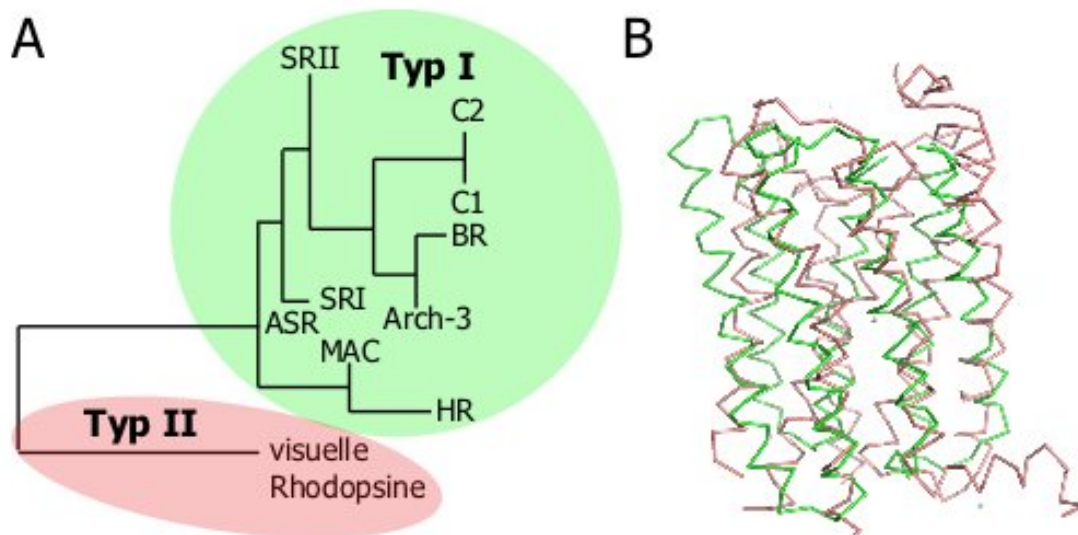


Abbildung 1.3: Phylogenetischer Stammbaum und Faltungsmotiv von Vertretern aus der Superfamilie der Opsine. **A** zeigt einen phylogenetischen Baum der Opsine mit einer starken Ausrichtung auf die mikrobiellen beziehungsweise Typ I Rhodopsine. Die Primärsequenzen wurden entweder aus den pdb- oder ncbi Datenbank entnommen. Das visuelle Rhodopsin (Rh) aus *Bos taurus* steht exemplarisch für Typ II Rhodopsine. Mikrobielle Rhodopsine sind Senosorhodosin I und II (SRI [P33743] und SRII [2KSY.pdb]), Anabaena Sensorhodosin (ASR1 [XIO]), Bakteriorhodosin (BR [1JV6.pdb]), Halorhodopsin (HR [2JAF.pdb]), Kanalarhodopsin 1 und 2 (C1 [AAL08946] und C2 [ABO64386]), Archäerhodopsin 3 (Arch3 [gp:ADB03110] [14]) und die Protonenpumpe aus *Leptosphaeria maculans* (MAC [gp:ADB03112][14]). Der phylogenetische Baum wurde mit dem Programm Phylogeny.fr generiert [15]. In **B** wurden die Kristallstrukturen von BR (grün) und Rh (rosa) mit Pymol übereinander gelegt.

Die ChRs gehören zur Proteinsuperfamilie der Opsine. Proteine dieser Superfamilie besitzen 7 Transmembranhelices in einer familientypischen Faltung (siehe Abbildung 1.3 **B**). Das Vitamin-A Derivat Retinal dient als Chromophor und ist über eine protonierte Schiff'sche Base ($RSBH^+$) an die ϵ -Aminogruppe eines konservierten Lysins der Helix G an das Apoprotein Opsin gebunden [16]. Dieses Holoprotein wird als Rhodopsin bezeichnet [17].

Die Superfamilie zerfällt in zwei große Gruppen, den Typ I, den mikrobiellen

Rhodopsinen und den Typ II, den visuellen Rhodopsinen [18]. Diese Unterteilung erfolgt anhand von unterschiedlich konservierten Aminosäuren in der Bindungstasche des Retinals. Die ChRs gehören nach dieser Einteilung zu den Typ I Rhodopsinen (siehe Abbildung 1.3 A). Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal der Typ I Rhodopsine, ist das verwendete *all-trans*-Retinal im Gegensatz zu den in Typ II Rhodopsinen verwendeten *11-cis*-Retinal. Während beim Typ I Rhodopsin der Ko-Faktor während der Photozyklen kovalent gebunden bleibt und am Protein thermisch reisomerisiert, wird der Ko-Faktor in den Typ II Rhodopsinen bei jedem Zyklus ausgetauscht.

Funktionell werden die Rhodopsine in drei Gruppen eingeteilt: sensorische Rhodopsine, lichtaktivierte Pumpen und Kanäle [2]. Sensorische Rhodopsine reagieren auf eine Vielzahl von externen Stimuli und vermitteln diese auf zellspezifische Signalkaskaden. Hierunter fallen alle visuellen Rhodopsine (Typ II), aber auch zum Beispiel die Sensorrhodopsine I und II (Typ I). Die Gruppe der lichtgetriebenen Pumpen transportieren pro absorbierten Photonen ein Ion gegen seinen elektrochemischen Gradienten unter physiologischen Bedingungen. Zu ihr gehören beispielsweise die Protonenpumpe BR oder die Chloridpumpe HR.

Nach dieser funktionellen Einteilung bilden die lichtaktivierten ChRs eine eigene Gruppe. Ein ChR ermöglicht, dass pro absorbiertem Photon Ionen entsprechend ihres elektrochemischen Gradienten die Membran passieren. Zu ihr gehören die *Clammydomonas* Rhodopsine 1 und 2 (C1 und C2) und die *Volvox* Rhodopsine 1 und 2 (V1 und V2) [19, 20, 21, 22, 13].

Obwohl alle bisher entdeckten Rhodopsine ähnliche Strukturmerkmale aufweisen (siehe Abbildung 1.3 B), unterscheiden sich die Primärsequenzen erheblich voneinander. Typ I und Typ II Rhodopsine besitzen keine Sequenzhomologie zueinander [23]. Innerhalb der Typ I Familie besitzen die ChRs eine Sequenzhomologie von lediglich 15 - 20 % zu HR, BR oder auch SRI und II [19] (siehe phylogenetischen Baum in Abbildung 1.3 A und Sequenzvergleich im Anhang A.2).

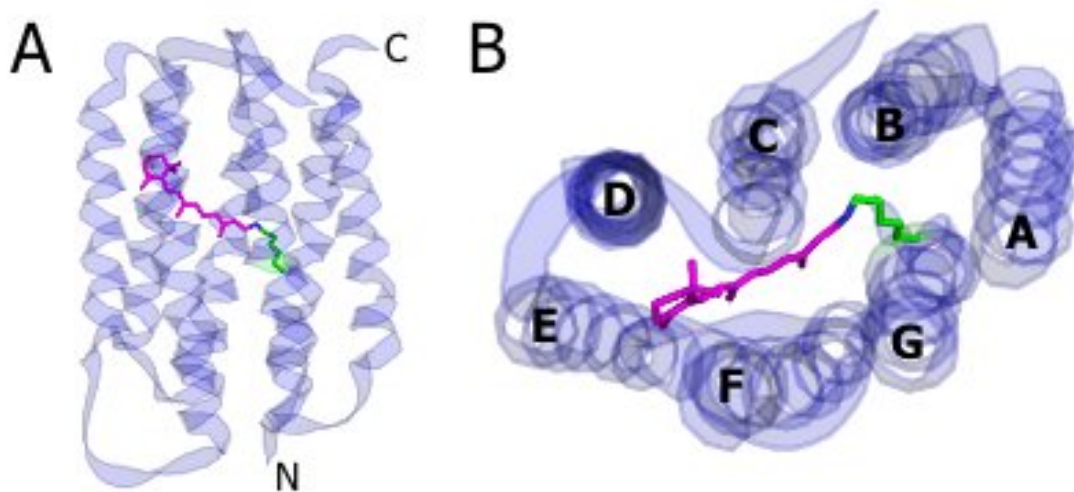


Abbildung 1.4: Modell der dreidimensionalen Struktur des membrandurchspannenden Teils von C2 auf Grundlage der experimentell bestimmten Röntgenkristallstruktur von BR (1KGB [24]). **A** zeigt eine Seitenansicht der modellierten Kanalrhodopsinstruktur. Das *all-trans* Retinal (*rosa*) ist an die ϵ -Aminogruppe C2 K257 über eine Schiff'sche Base kovalent an das Rhodopsin gebunden. Die Helices sind als *Cartoon* dargestellt. **B** ist eine Draufsicht auf die in **A** gezeigt Struktur.

1.2.2 Molekularer Aufbau

Der erste um 2002 charakterisierte lichtgesteuerte Ionenkanal, C1, besteht aus 712 As. Die 7 Transmembranhelices werden durch die ersten ~ 340 As kodiert [19]. Die auf die Transmembrandomänen gekürzte C1 Version zeigt einen nahezu identischen Photostrom verglichen mit der ursprünglichen *wt* Version [19]. Auch im C2 mit 737 As sind die ersten ~ 310 As ausreichend um ein funktionelles Protein zu bilden [20]. Alle in dieser Arbeit aufgeführten Aussagen beziehen sich auf die gekürzten Versionen (≤ 340 As).

Da die dreidimensionale Struktur der ChRs bis kurz vor Ende dieser Dissertation nicht bekannt war, wurde während der Arbeit auf ein Homologiemodell auf Basis von Kristallstrukturen anderer Typ I Rhodopsine zurück gegriffen. In Abbildung 1.4 **A** und **B** ist ein hypothetisches Strukturmodell von C2 basierend auf der Kristallstruktur von BR dargestellt (1KGB [24]). Das Strukturmodell wurde auf Grundlage des Sequenzvergleiches von Suzuki *et al.* und den Software Routinen des Swiss

PDB Viewers generiert [22]. Neben der typischen Opsinfaltung mit dem extrazellulär gelegenen N-Terminus und dem intrazellulären C-Terminus fallen die großen, ins Zytoplasma gerichteten, unstrukturierten Bereiche auf. Ob es sich hierbei tatsächlich um unstrukturierte Bereiche oder nur Modellierungsartefakte handelt, konnte erst eindeutig mit der Kristallstruktur entschieden werden [25].

Chr1	---	MSRRPWLLALALAVALAAGSAGASTGSDATVPVATQDGPDYVFHR-AHERMLFQTS	55		
Chr2	-----	-----MDYGGALSAVGRELLFVT	18		
			* * *		
Chr1	YTL	NGSVICIPNN---	GQCFCLAWLK	NGTNAEKLAANILQWITFALSALCLMFYGY	111
Chr2	NPVV	NGS-VLVPE---	DQCYCAGWIE	RTNGAQTASNVLQWLAAGFSILLMFYAY	72
		*** . . *	* * * . * . * * *	* * * * * . . * * * * * *	

Abbildung 1.5: Zeigt den N-terminalen Sequenzvergleich zwischen C1 und C2. Der vollständige Sequenzvergleich ist in Anhang A.2 dargestellt. Die O-Glykolisierungsstellen sind mit *durchgezogener* Linie eingerahmt. Die N-Glykolisierungsstellen sind mit *gestrichelten* Rahmen dargestellt.

Der N-Terminus von C1 besitzt zwei potentielle N-Glykolyisierungsstellen an Position C1 N61 und N82 und zwei O-Glykolyisierungsstellen an C1 T25 und T30. Der N-terminale Bereich von C2 ist um 39 As kürzer als der von C1 und besitzt nur eine potentielle N-Glykolyisierungsstelle (C2 N24) und keine O-Glykolyisierungsstellen.¹

Sequenzvergleiche mit anderen Typ I Rhodopsinen wie HR und BR weisen eine besonders geringe Homologie mit den Helices A und B auf. Es wird vermutet, dass strukturelle Ursachen für die funktionellen Verschiedenheiten der ChRs zu den lichtgetriebenen Pumpen in diesem Bereich kodiert sind [22].

Helix G endet laut Sequenzvergleichen und Hydrophobizitätsalgorithmen für C1 bei As 280 und für C2 bei As 310. Aufgrund der identischen Photostromverläufe von Konstrukten mit und ohne C-terminalen Proteinmarker kann ein Einfluss auf den Photostromverlauf ausgeschlossen werden (Fusion ab As C1 356 und C2 315-25) [20, 28]. Der molekulare Aufbau der funktionellen Einheit ist in Abbildung 1.4 dargestellt, wobei

¹Programme: N-GlycoSite [26] und NetOGlyc [27]

das Retinal (*rosa*), die RSBH⁺ (*blau*) und das C2 K257 (*grün*) gezeigt sind. Nach Lichtabsorption wird das *all-trans* Retinal an der Doppelbindung zwischen C13 und C14 in die *13-cis* Form isomerisiert [29]. Diese Konformationsänderung initiiert eine Welle von größeren Reorientierungen im Proteingerüst, die dann schlussendlich zum Öffnen einer Pore im Rhodopsin führen [30, 31, 32]. Die Pore ist durchschnittlich 20 *ms* geöffnet [33, 34]. Nach Reprotonierung der retinalen Schiffischen Base (*RSB*) reisomerisiert das Retinal thermisch in die *all-trans* Konformation zurück [35].

1.2.3 Eigenschaften von Kanalrhodopsinen

Absorption

Freies in Methanol gelöstes *11-cis* Retinal absorbiert Licht der Wellenlänge ~ 380 *nm* am stärksten [36]. Bereits *11-cis* Retinal, welches über eine Schiffische Base an ein N-Butylamine gekoppelt ist, besitzt eine um 60 *nm* verschobene maximale Absorption bei 440 *nm* [36]. An Rhodopsin gebundenes Retinal kann sehr verschiedene Absorptionsspektren besitzen. Beispielsweise absorbieren einige Invertebraten Rhodopsin im UV-Bereich bei 354 *nm* [37]. Dagegen absorbiert das SRI bei 590 *nm* und wiederum weist das rote Rhodopsin in den Zapfenzellen einiger Vertebraten wie zum Beispiel denen des Goldfisches, eine maximale Absorption von 625 *nm* auf [29]. Die maximale Absorption der Rhodopsine besitzt also eine mögliche Spannbreite von ~ 270 *nm*. Die halbmaximale Breite der einzelnen Rhodopsinspektren liegt bei ~ 90 *nm*. Entscheidend für die jeweilige maximale Absorption ist die Verteilung von As in der Nähe des Retinals, aber auch weiter entfernte As können über komplexe Strukturveränderungen einen Einfluss auf die Absorption haben [38].

Die Absorptionsänderung von einem protonierten schiffischen Retinal in Lösung und dem gebundenen Retinal im Protein wird als Opsinverschiebung bezeichnet. Sie ist abhängig von den elektrostatischen Bedingungen in der Nähe des Retinals. Neben den elektrostatischen Ursachen ist im Allgemeinen auch die Geometrie des Retinalmoleküls von entscheidender Bedeutung für die Absorption; im Falle der Typ I Rhodopsine spielt sie nur eine untergeordnete Rolle, da Aminosäuren, die einen Einfluss auf Geometrie des

Retinals haben, in Typ I Rhodopsinen streng konserviert sind [38]. Einen entscheidenden Einfluss auf die Absorption von mikrobiellen Rhodopsinen hat die elektrostatische Verteilung von Ladungen und die Ausrichtung des permanenten Dipols gegenüber dem Retinal [39, 40]. Experimentelle und theoretische Untersuchungen zeigen, dass polare Aminosäuren nahe des β -Iononringes das Absorptionsspektrum in Richtung längerer Wellenlängen verschieben, wohingegen polare Aminosäuren in der Nähe des $RSB/RSBH^+$ Komplexes das Spektrum zu kürzeren Wellenlängen verschieben [41].

Typ I Rhodopsin	Herkunft	max. Absorption [nm]	Referenz
SRI	<i>Natronomonas pharaonis</i>	587 nm	[42]
HR	<i>Natronomonas pharaonis</i>	578 nm	[43]
BR	<i>Natronomonas pharaonis</i>	568 nm	[44]
Arch-3	<i>Halobacterium sodomense</i>	566 nm	[14]
MAC	<i>Leptosphaeria maculans</i>	550 nm	[14]
ASR	<i>Anabaena Sp. Pcc7120</i>	549 nm	[45]
SRII	<i>Natronomonas pharaonis</i>	500 nm	[38]
C1	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	460 nm	[46]
C2	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	460 nm	[46]

Tabelle 1.2: Auflistung verschiedener Typ I Rhodopsine geordnet nach ihrer maximalen Absorption. Hierbei wurden alle mikrobiellen Rhodopsine aus Abbildung 1.3 A aufgeführt. C1 und C2 zeigen für die hier ausgewählten Rhodopsine die niedrigste maximale Absorptionswellenlänge.

C1 besitzt bei neutralem pH Wert ein Absorptionsmaximum (λ_{max}) von 460 nm. Bei saurem pH-Wert verschiebt sich dieses auf 500 nm [46]. Diese protochrome Absorptionsänderung konnte größtenteils auf ein in Helix B lokalisiertes Glu (C1 E83) zurückgeführt werden [46]. C2 besitzt an der homologen Position ein Ala und zeigt keine Abhängigkeit des Absorptionsspektrums (460 nm) vom pH Wert [20].

Photostromprofile und Kinetik

Elektrophysiologische Messungen an Kanalrhodopsin-exprimierenden Zellen weisen einen typischen Photostromverlauf bei Belichtungsdauern ≥ 100 ms auf (siehe Abbildung 1.7 A). Wichtige Parameter zum eindeutigen Bestimmen des Photostromprofils sind

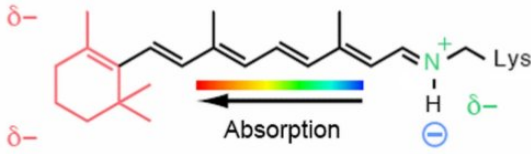


Abbildung 1.6: Illustriert den Einfluss von polaren Aminosäuren auf die Absorptionseigenschaften des am Rhodopsin gebundenen *all-trans* Retinals. Austausch von unpolaren As gegen polare As am β -Iononring führen zu einer Rotverschiebung der Absorption. Dagegen führen polare Austausche in der Nähe von $RSB/RSBH^+$ zu einer Blauverschiebung [41]

in Abbildung 1.7 A gezeigt. Durch Blitzlichtexperimente an *C. reinhartii* konnte die nötige Zeitdauer von Anregung bis zum maximalen Photostrom (t_{max}) auf $\leq 100 \mu s$ abgeschätzt werden, was bereits ein Indiz für die direkte Kopplung von lichtsensitiver Domäne und Ionenkanal war [11, 47].

Der t_{max} ist eine intrinsische Kenngröße der ChRs. Auch bei Experimenten mit Lichtblitzen ($\leq 100 \mu s$) in heterologen Expressionssystemen konnte ein von der Lichtintensität unabhängiger t_{max} von weniger als $200 \mu s$ bestimmt werden [31]. Dagegen scheint t_{max} eine starke Lichtabhängigkeit in Experimenten mit Lichtpulsen ($\geq 10 ms$) aufzuweisen. Denn bei Experimenten mit Belichtungsdauern größer als t_{max} , werden die Rhodopsine zu signifikant verschiedenen Zeitpunkten aktiviert und der maximale Photostrom wird daher erst zu einem späteren Zeitpunkt erreicht; der phänomenologische t_{max} vergrößert sich [48]. Auch die Inaktivierungskinetik (τ_{Iak}) und Abklingkinetik (τ_{Abk}) verlangsamten sich bei geringeren Lichtintensitäten (siehe Abbildung 1.7 A). Für t_{max} , τ_{Iak} und τ_{Abk} konnte außerdem eine Temperaturabhängigkeit nachgewiesen werden [49].

Selbst die Inaktivierung, also das Verhältnis $(I_{trans}-I_{stat})/I_{trans}$ ist stark von der Lichtintensität beeinflusst.

Bei abnehmenden Lichtintensitäten nimmt die Inaktivierung stark ab und verschwindet vollständig bei sehr geringen Intensitäten. Dieses Verhalten kann rechnerisch simuliert werden, wenn 2 Photozyklen mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten und Extinktionskoeffizienten angenommen werden (siehe Abbildung 1.7 B) [51, 28]. Der τ_{Iak} liegt in Oozyten für C1 bei $\sim 15 ms$ und für C2 bei $\sim 35 ms$ [46]. Bei neutralem pH-Wert beträgt τ_{Abk} für C1 $\sim 7 ms$ und für C2 $\sim 16 ms$. Bei

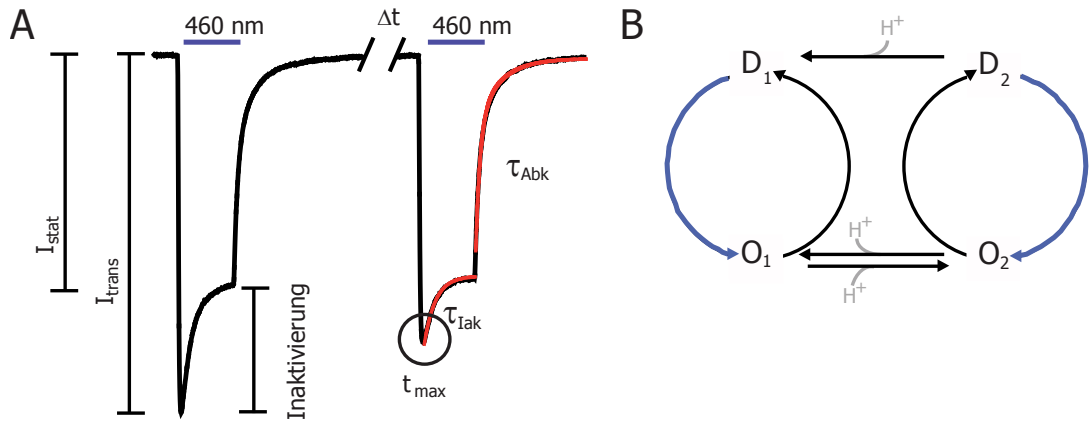


Abbildung 1.7: Erläutert anhand eines repräsentativen ChR Photostromprofils relevante Messgrößen. **A** zeigt eine Stromspur eines Doppelpulsexperimentes. Die aufgeführten Parameter sind stationärer Photostrom (I_{stat}), transienter Photostrom (I_{trans}), Inaktivierung, Zeitdauer bis zum maximalen Strom t_{max} , Abklingkinetik von transienten zum stationären Photostrom (τ_{Iak}) und die Abklingkinetik nach dem Beenden der Belichtung (τ_{Abk}). Die Erholungskinetik (τ_{Erk}) beschreibt das von Δt abhängige Regenerieren des transienten Stromes beim 2. Belichtungspuls. **B** zeigt den elektrophysiologischen Photozyklus mit 4 Zuständen (4-Zustandsmodell) mit 2 offenen, lichtadaptierten (O_1 und O_2) und 2 geschlossenen, dunkeladaptierten Zuständen (D_1 und D_2). Dieser kann den Photostromverlauf wie in A für eine gegebenen Lichtintensität beschreiben [50]. Die farbigen Pfeile illustrieren photochemische Reaktionen mit den entsprechenden farbkodierten Wellenlängen.)

hoher extrazellulärer $[H^+]$ verlangsamt sich τ_{Abk} und kann dann nur hinreichend genau mit einer biexponentiellen Funktion beschrieben werden [46, 51, 28]. Auch dieser experimentelle Befund erhärtet die Hypothese von zwei Photozyklen mit unterschiedlichen Geschwindigkeitskonstanten (siehe Abschnitt 1.2.3 Photozyklus). Des Weiteren hängt τ_{Abk} auch von der Membranspannung ab. Bei Variation der Membranspannung von $-100 - 40 \text{ mV}$ verlangsamt sich τ_{Abk} bei beiden ChRs um ungefähr den Faktor 2 [46, 52].

Die Erholungskinetik (τ_{Erk}) kann im Doppelpulsexperiment bestimmt werden. Bei zwei kurz hintereinander applizierten Lichtpulsen ist der transiente Photostrom beim zweiten Puls kleiner als beim ersten (siehe Abbildung 1.7 A). Je größer die Zeitdauer zwischen den beiden Lichtpulsen, desto stärker nähern sich die beiden transienten Photostrome einander wieder an. Der τ_{Erk} von C2 wird bei hohen $[H^+]_e$ und negativen

Membranspannungen beschleunigt [20, 52].

	t_{max}^* (ms)	Inaktivierung (%)	τ_{Iak} (ms)	τ_{Abk} (ms)	$\tau_{Erk,0mV}$ (s)
C1	1.5 – 3	33	25	7	50
C2	1.5 – 3	71	48	16	10

Tabelle 1.3: Zusammenfassung wichtiger kinetischer Parameter der beiden nativen *Chlamydomonas* ChRs. Die Parameter wurden in Oozyten bei -75 mV und einem pH_o 7.5 bestimmt. Daten aus Tsunoda *et al.* und persönliche Mitteilung von Satoshi Tsunoda [46]. (* Aus Messungen mit Lasersystem ohne kapazitive Kompensationen.)

Die Zuordnung der kinetischen Parameter zu den jeweiligen Geschwindigkeitskonstanten im 4-Zustandsmodell fällt für einige Parameter schwer, da sie sich aus zusammengesetzten Reaktionsschritten ergeben. Im elektrophysiologischen Photozyklus entspricht τ_{Erk} dem H^+ -sensitiven Gleichgewicht zwischen den Dunkelzuständen D_1 und D_2 . Bei einem vollständig dunkeladaptierten ChR ist t_{max} bei hoher Lichtintensität durch den Übergang von $D1 \rightarrow O1$ definiert. Der τ_{Iak} und τ_{Abk} sind zusammengesetzte Vorgänge, die aus unterschiedlichen Übergängen zwischen von $O1 \rightarrow D1$, $O2 \rightarrow D2$, $O1 \leftrightarrow O2$ und $D2 \rightarrow D1$ bestehen [50].

Selektivität

Kanalrhodopsine leiten monovalente sowie auch einige divalente Kationen [46]. Für monovalente Kationen gilt: je kleiner der Atomradius, desto besser ist ihre Leitfähigkeit: $P_{H^+} \gg P_{Li^+} > P_{Na^+} > P_{K^+}$ [19, 20]. Die relativen Ionenpermeabilitäten wurden an Oozyten gemessen, in denen die intrazelluläre Ionenzusammensetzung nicht kontrolliert werden kann. Die Permeabilität von Protonen wurde hierbei $\sim 1 \cdot 10^6$ x höher bestimmt als die von Natrium [20]. Kanalrhodopsine sind auch für divalente Kationen entsprechend ihres Atomradius permeabel: $P_{Ca^{2+}} \gg P_{Sr^{2+}} > P_{Ba^{2+}}$. Bereits frühe Experimente demonstrierten, dass der Photostrom in *C. reinhardtii* Ca^{2+} getragen ist. Die daraus lichtabhängige Veränderung der Ca^{2+} Konzentration moduliert das Flagellenschlagmuster in der Grünalge [47, 53]. Obwohl Mg^{2+} den kleinsten Atomradius aufweist, führen Konzentrationen $\geq 1\text{ mM}$ zum inhibieren des Photostroms in

C.reinhardtii [54]. In heterologen Expressionssystemen verringert Mg^{2+} zwar auch die Photostromamplituden was auf ein Blocken der Poren schließen lässt, aber die konzentrationsabhängige Verschiebung der Umkehrpotentiale demonstriert das Mg^{2+} geleitet wird [55].

Guanidinchlorid (GCl) weist trotz seines großen Molekülradius einen 2 – 3 x so großen Photostrom bei pH 7.4 wie bei entsprechenden Na^+ Messungen auf [20, 34]. Ob dieser Effekt tatsächlich aufgrund einer Leitfähigkeit für GCl oder nicht doch vielmehr aufgrund einer schnelleren Diffusion von Guanidin gepufferten H^+ entlang der Membran erfolgt, ist ungeklärt.

Die ChRs unterscheiden sich von anderen Typ I Rhodopsinen insbesondere in den Helices A und B. Hierbei sind die in Helix B auftretenden Glutamate (C2 E82, E83, E90, E97 und E101) auffällig. Ein hydrophober Austausch der Glu gegen Ala hat Einfluss auf die kinetischen Parameter, aber der Einfluss auf die Selektivität wurde nur unzureichend bestimmt [56]. Die Mutation E90Q, die im Vergleich zu E90A eine milde sterische Veränderung darstellt, besitzt eine 10 x höhere Na^+ Leitfähigkeit als der C2 *wt* [32]. Die beiden Mutationen der vermeintlichen Gegenionen C2 E123T und C2 H134R in Helix C und D verringern beziehungsweise erhöhen die Photostromamplitude und verringern beide die Leitfähigkeit von Protonen gegenüber monovalenten Kationen [20, 55, 34]. Auf der Grundlage dieser experimentellen Befunde wird vermutet, dass die Ionenselektivität der ChRs in Helices A und B kodiert ist.

Unter der Annahme, dass die Expressionsdichte und der Absorptionsquerschnitt von C2 und BR in Oozyten ähnlich sind, wurde für C2 eine Einzelkanalleitfähigkeit von 50 *fS* abgeschätzt [19]. Eine solche Leitfähigkeit liegt unterhalb der Auflösungsgrenzen für derzeitige Patch-Clamp Systeme und kann daher nicht direkt gemessen werden [57]. Mittels stationärer Rauschanalyse konnte aber eine Einzelkanalleitfähigkeit von 40 *fS* und eine Öffnungsdauer von ~ 30 *ms* bei 200 *mM* NaCl bestimmt werden [34] (je 2 *mM* Ca^{2+} und Mg^{2+}). In einer nichtstationären Rauschanalyse, die vorwiegend den transienten Photostromanteil berücksichtigt, wurde eine größere Einzelkanalleitfähigkeit von 1084 *fS* ermittelt [58] bei 145 *mM* NaCl (0.1 *mM* Ca^{2+} 2 *mM* Mg^{2+}). Die

große Abweichung zwischen beiden Werten liegt neben den methodischen Unsicherheiten und den verschiedenen ionalen Bedingungen auch daran, dass in der stationären Rauschanalyse vorwiegend nur der O_2 Zustand untersucht wurde. Auch in einem 4-Zustandsmodell in dem das Phänomen der Inaktivierung und der Lichtabhängigkeit berücksichtigt wurde, wurde eine 20 x höhere Leitfähigkeit für O_1 angenommen [28]. Nach den experimentellen Befunden würden demnach pro Öffnung $\sim 560 - 15000$ Ionen pro Kanal und absorbierten Photonen über die Membran fließen.

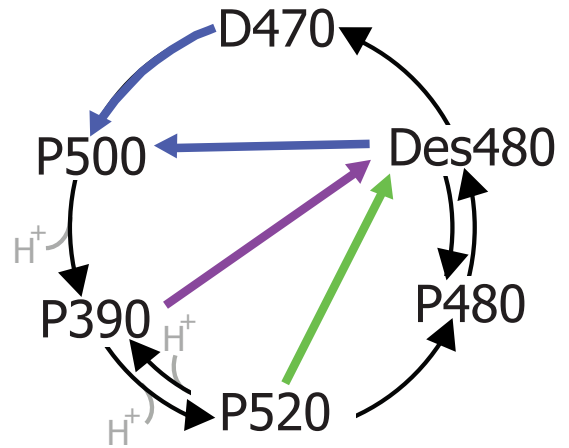
Photozyklus

Ein Photozyklus beschreibt einzelne Reaktionsschritte eines Photorezeptors nach Absorption eines Photons. Die einzelnen Schritte manifestieren sich entweder als Konformationsänderung des Proteins und/oder des Chromophors. Unter natürlichen Umständen kehrt der Photorezeptor in den erneut anregbaren Dunkelzustand zurück. Nicht jede dieser Konformationen geht mit einer Veränderung der elektrophysiologischen Parameter einher. Daher werden Methoden wie zeitaufgelöste Absorptions-, Infrarot- und Resonanz- und Ramanspektroskopie benutzt, um elektrophysiologisch blinde Zustände zu entdecken und zu charakterisieren [31, 30, 32, 59]. Mit Hilfe von Absorptionsmessungen am aufgereinigten Protein wurden mindestens 5 spektroskopische Zustände während eines Photozykluses identifiziert (siehe Abbildung 1.8) [31, 30].

Der Dunkelzustand D470 wird durch Absorption eines Photons in $\leq 50 \text{ ns}$ in den P500 Zustand überführt. Dieser Reaktionsschritt entspricht der Isomerisierung des *all-trans* Retinals in die *13-cis* Form. Auch der desensibilisierte Zustand Des480, der im Dunkeln innerhalb von Sekunden in den D470 Zustand übergeht, kann photochemisch direkt in den P500 Zustand gebracht werden. Die Isomerisierung des Retinals kann also aus 2 Dunkelzuständen D470 und Des480 erfolgen [31, 30]. Zwischen Des480 und D470 besteht entweder ein thermisches Gleichgewicht oder eine unidirektionale Reaktion von Des480 \rightarrow D470. Beide Reaktionen vollziehen sich innerhalb von Sekunden.

Nach der Isomerisierung erfolgt die Deprotonierung von $RSBH^+ \rightarrow RSB + H^+$, was zu einer spektralen Blauverschiebung in den P390 Zustand führt. Das deprotonierte

Abbildung 1.8: Zeigt den unverzweigten spektroskopischen Photozyklus nach Stehfest und Hegemann [50]. Die dicken, farbigen Pfeile symbolisieren eine photochemische Reaktion auf die gerichteten Intermediate. Die Farbe der Pfeile entspricht auch der ungefähren Wellenlänge. Die schwarzen, dünnen Pfeile verdeutlichen thermische beziehungsweise chemische Übergänge. Deprotonierungs- und Reprotonierungsreaktionen sind in grau dargestellt.



P390 Intermediat steht im Gleichgewicht mit dem protonierten P520 Intermediat. Dieses Gleichgewicht ist stark H^+ abhängig und bei niedrigen pH Werten stark in Richtung des P520 Zustandes verschoben. Beide Intermediate gelten als potentielle Kandidaten für den geöffneten, leitenden Zustand. Laut des elektrophysiologischen Photozyklus könnten auch beide Zustände elektrisch leitend sein (siehe Abbildung 1.7 B). Auch wenn nur einer der beiden spektroskopischen Zustände leitend wäre, würde der elektrophysiologische Photozyklus aus Abbildung 1.7 B weiterhin konsistent sein, da O_1 und O_2 aus zwei spektroskopisch schwer zu unterscheidenden leitenden Zuständen bestehen könnte (P390(1) und P390(2) beziehungsweise P520(1) und P520(2)). Das P520 Intermediat relaxiert thermisch in den P480 Zustand. Dieser Übergang führt zum Verarmen des leitenden Zustandes und somit zum Schließen des Kanals. Die spektroskopische Zeitkonstante für $P520 \rightarrow P480$ von $\sim 10 \text{ ms}$ stimmt gut mit dem τ_{Abk} vom 18 ms für C2 überein [30]. Der besonders bei hohen H^+ Konzentrationen ausgeprägt biexponentielle Charakter von τ_{Abk} ist durch das H^+ -sensitive Gleichgewicht zwischen P390 und P520 bedingt.

Wenn angenommen wird, dass P500, P390 und P520 spektroskopisch nicht zu unterscheidendes Ebenbild besitzen, kann der spektroskopische Photozyklus (Abbildung 1.8) leicht in den doppelten elektrophysiologischen Zyklus überführt werden (Abbildung 1.7) [50].

1.3 Kanalarhodopsine in der Optogenetik

1.3.1 Was ist Optogenetik?

Karl Deisseroth führte den Begriff Optogenetik 2006 mit folgenden Worten ein:

"...combines genetic targeting of specific neurons or proteins with optical technology for imaging or control of the targets within intact, living neural circuits." [60]

Es handelt sich also in erster Linie um eine interdisziplinäre Technologie, die es erlaubt, mit Hilfe von lichtsensitiven, genetisch-kodierten Stimulatoren und Sensoren neurophysiologische Experimente am lebenden Organismus durchzuführen. Die lichtensitive Komponente birgt gegenüber herkömmlichen Elektrodensystemen den Vorteil, dass ein mechanisches Verletzen des Gewebes ausgeschlossen wird. Des Weiteren besitzen optische Systeme, insbesondere bei der Zwei-Photonenanregung, eine höhere räumliche ($\leq 1 \mu m^2$) und auch zeitliche Auflösung ($\leq 10 ns$) als elektrische Systeme [61, 62, 63].

Die genetische Komponente sorgt mittels spezifischer Promotoren, Rekombinations- und viraler Transduktionssysteme für eine zielgerichtetes Auswählen einer bestimmten Zellpopulation [64].

Die Optogenetik eignet sich aber nicht nur dafür, grundlegende Fragen in der Neurophysiologie zu beantworten, auch die angewandte Medizin testet ChR-basierte Therapieansätze wie zum Beispiel der Einsatz als visuelle Prothetik, als lichtgetriebener Herzschrittmacher oder als nichtinvasiver Tiefenstimulator für Parkinsonpatienten [65, 66, 67]. Durch die einfache Fixierung eines Lichtleiters an eine Kanüle, die operativ in die Schädelplatte der Mäuse eingeführt wurde, können einfach und reproduzierbar Experimente an der sich bewegenden Maus gemacht werden. Einzelzellmessungen mittels Patch-Clamp an frei beweglichen Mäusen stellen dagegen hohe experimentelle Anforderungen [68]. Auch die Pharmaindustrie schreibt ChRs-basierten Hochdurchsatzsystemen zur Wirkstoffprüfung an Ionenkanälen ein großes Potential zu [69].

Optogenetische Stimulatoren

Im Allgemeinen kann durch die Expression von ChRs im Empfängergerewebe das Membranpotential wellenlängen- und intensitätsabhängig mit Licht depolarisiert werden. Andere Typ I Rhodopsine wie HR und BR können auch das Zielgewebe reizen in dem sie die Zellen hyperpolarisieren und dienen somit ebenfalls als Stimulator [70, 64]. Der Chromophor *all-trans* Retinal ist in den meisten Geweben endogen in ausreichender Menge vorhanden. Da die elektrogenen Pumpen pro Photon nur ein Ion transportieren, ist die Effizienz, mit der sie das Membranpotential verändern, geringer als das der ChRs.

Auch mittels chemisch und genetisch modifizierter ionotroper Glutamatrezeptoren können Neuronen mit Licht depolarisiert werden. Hierfür wird in der Nähe des Porenmundes eines ionotropen Glutamatrezeptors ein Cystein eingeführt (iGluR6 L439C Mutante). Das über Licht isomerisierbare Maleimid-Azobenzen-Glutamat (MAG) wird dann über eine Thiolbindung an das eingeführte Cystein gekoppelt. Der Glutamatrezeptor kann so mit 380 nm geöffnet und 500 nm wieder geschlossen werden [71, 72]. Der so modifizierte Kanal wird als *LiGluR* bezeichnet und besitzt eine Natrium- und Kaliumpermeabilität. Abhängig von verschiedenen gewebespezifischen Modulatoren besitzt *LiGluR* eine 25 – 200 x höhere Einzelkanalleitfähigkeit als C2. Daher würde die Zelle pro absorbierten Photonen stärker depolarisieren als im Falle von C2 [73]. Die Unspezifität des MAGs, der geringere Extinktionskoeffizient ($\sim 2 \cdot 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^2$ [74]), die unnatürliche Hinzuführung und die kurzweilige Anregung sind klare Nachteile gegenüber rein optogenetischen Systemen wie zum Beispiel das der ChRs. Dagegen konnte die optochemische Methode relativ einfach auf einen Kalium-spezifischen Glutamatrezeptor übertragen werden (*HyLighter*), welcher somit das hyperpolarisierende Gegenstück zum *LiGluR* mit gleich hoher Effizienz darstellt [75].

Neben diesen membrangebundenen Stimulatoren finden auch photoaktivierbare Zyklasten (*PAC*) aus der Gruppe der Flavoproteine Anwendung. Diese lichtabhängigen Adenylat- oder Guanylatzyklasten zyklisieren ATP beziehungsweise GTP zu den

Signalstoffen cAMP und cGMP [76, 77, 78].

Optogenetische Sensoren

Neben dem optischen Stimulieren von Zellen wird von einer weiter entwickelten Optogenetik auch das gleichzeitige optische Auslesen von zellulären Parametern mittels genetisch-kodierten Sensoren verlangt. In den letzten 20 Jahren wurden GFP-basierte FRET Systeme (*Förster Resonanz Energie Transfer*) entwickelt, die es erlauben, verschiedene Zellsignale wie cGMP, cAMP, Membranspannung, pH-Wert und $[Ca^{2+}]$ optisch zu detektieren [79, 80, 81, 82, 83]. Insbesondere die Empfindlichkeit der Kalzium-sensitiven Sensoren ist ausreichend, um relevante intrazelluläre Kalziumkonzentrationsänderungen zu detektieren [84]. Zum Beispiel treten kurze, transiente Kalziumkonzentrationsänderungen bei Aktionspotentialen (APs) in Neuronen auf. Während der depolarisierenden Flanke des APs öffnen sich bei höheren Membranspannungen die sogenannten HVA Kalziumkanäle (*High Voltage Activated*). Dieser kurzzeitige Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration unterstützt ein schnelles Repolarisieren, da neben den dafür verantwortlichen spannungsabhängigen Kaliumkanälen zusätzlich auch kalziumabhängige BK Kanäle (*Big Potassium*) geöffnet werden [85]. Diese transiente Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration kann durch genetisch-kodierte Kalziumsensoren detektiert werden [84].

Die ersten Versionen von Kalziumsensoren basierten auf einem Paar von spektral überlappenden fluoreszierenden Proteinen (fPs). Hierbei wurden die beiden fPs mit einer kalziumbindenden Proteindomäne wie Calmodulin und der M13-Interaktionsdomäne aus der leichten Kette der Myosinkinase linear miteinander verbunden. Durch die Bindung von Kalzium werden hydrophobe Bereiche im Calmodulin exponiert, die dann mit der M13-Domäne interagieren. Die damit einhergehende Konformationsänderung orientiert die beiden fPs neu zueinander – die Effizienz des FRET wird dadurch erhöht [86]. Im Allgemeinen beruht der FRET auf einer strahlungslosen Übertragung der Anregung des kurzwelligen Donors auf den längerwelligen Akzeptor, der dann Fluoreszenz

emittiert. In solchen Systemen kann neben der Abnahme der Donorfluoreszenz auch die Fluoreszenzzunahme des Akzeptors detektiert werden. Die FRET basierten Kalziumsensoren können daher als Ratiofarbstoff verwendet werden und ermöglichen es, absolute Konzentrationen zu bestimmen.

Bei der zirkulären Permutation von fPs werden die ursprünglichen N- und C-Termini miteinander verbunden und durch Aufschneiden der virtuellen Ringform entstehen zwei neue Proteinenden. Durch strategisches Aufschneiden der Struktur und anschließender Fusion von Calmodulin und M13 Domäne an den neuen C-Terminus kann der konformationsinitiiierende Komplex näher an den Chromophor des fPs fusioniert werden. Diese so veränderten genetisch-kodierten Kalziumsensoren besitzen eine höhere Quantenausbeute und eine gesteigerte Sensitivität gegenüber Ca^{2+} [87, 88]. Diese sogenannte *GCaMPs* bestehen somit aus nur einem fP und können daher nicht als Ratiofarbstoff verwendet werden. Alle bisher publizierten monomeren und FRET-basierten Kalziumsensoren besitzen eine Exzitationswellenlänge $\sim 420 - 490 \text{ nm}$ und überlappen mit dem Anregungsspektrum von C2. Vor Kurzem wurde eine rote Variante veröffentlicht, die in Kombination mit blauen ChRs ein großes Anwendungspotential haben dürfte [89].

1.3.2 Anwendungen des Kanalrhodopsins in der Optogenetik

Die Optogenetik ist eine neue innovative Forschungsmethode mit vielen prospektiven Anwendungsmöglichkeiten. In diesem Abschnitt sollen einige, bereits realisierte optogenetische Anwendungen vorgestellt werden. Aus diesen hier kurz beschriebenen Anwendungen lassen sich neue Anforderungen an ChRs ableiten und einige Optimierungen an ChRs besser verstehen.

Das lichtgesteuerte Gehirn

Kanalrhodopsine werden häufig in der Neurophysiologie verwendet, um APs in Neuronen mittels kurzen Lichtpulsen auszulösen. Hierfür wurden ChRs mittels

eines zellspezifischen Promoters in verschiedenen Organismen wie dem Fadenwurm (*Caenorhabditis elegans*), der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*), der Hausmaus (*Mus musculus*), dem Zebrafisch (*Danio rerio*) und dem Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) exprimiert [90, 91, 92, 93, 94]. Abhängig von Zellgröße, Membrankapazität, Expressionslevel und Membranständigkeit sind Pulse von 5 – 20 ms und Lichtleistungen von $\sim 100 - 20\,000\text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ ausreichend, um APs auszulösen [95, 66]. Die ChRs depolarisieren hierbei die Zelle um 10 – 40 mV [96]. Diese Membrandepolarisierungen sind ausreichend, um spannungsabhängige Natriumkanäle zu öffnen und ein AP in Gang zu setzen. Die Latenzzeit zwischen appliziertem Lichtpuls und Aktionspotential ist neben der Wellenlänge und Lichtleistung auch abhängig von dem nativen t_{max} [49].

Neuronen repolarisieren innerhalb von $\leq 500\text{ }\mu\text{s}$ und sind somit schneller als der τ_{Abk} von C2. Bei höheren Pulsfrequenzen können die APs somit jeweils nur von dem Anteil an C2 Molekülen ausgelöst werden, die bereits wieder im Des480 oder D470 sind. Der Teil von noch geöffneten C2 Molekülen des vorherigen Pulses führt zu einem Versatz des Ruhepotentials [97]. Dieses sogenannte Plateaupotential liegt während der gesamten Dauer der Lichtpulsfolge an der Zelle an und kann zum Verändern der ionalen Gleichgewichtskonzentrationen und insbesondere des intrazellulären pH-Wertes führen [58]. Trotz der geringen Leitfähigkeit für Ca^{2+} unter physiologischen Bedingungen können Belichtungen $\geq 1\text{ s}$ die streng regulierte intrazelluläre Kalziumkonzentration verändern und kalziumabhängige Signalwege initiieren [98]. Kanalrhodopsine mit schnelleren τ_{Abk} verringern das Plateaupotential. In diesem Zusammenhang wären ChRs mit einer anwendungsoptimierten Ionenselektivität von herausragender Bedeutung für die Optogenetik.

Um tiefer gelegenes Gewebe zu aktivieren, werden Lichtleiter häufig weiter ins Gehirn eingeführt. Die dadurch entstehende mechanische Beanspruchung des Gehirns widerspricht dem eleganten, nichtinvasiven optogenetischen Ansatz. Um dieses Problem zu umgehen, sind sicherlich lichtsensitivere oder rotverschobene ChRs, deren Aktivierungswellenlänge dann tiefer ins Gewebe dringen kann, wünschenswert.

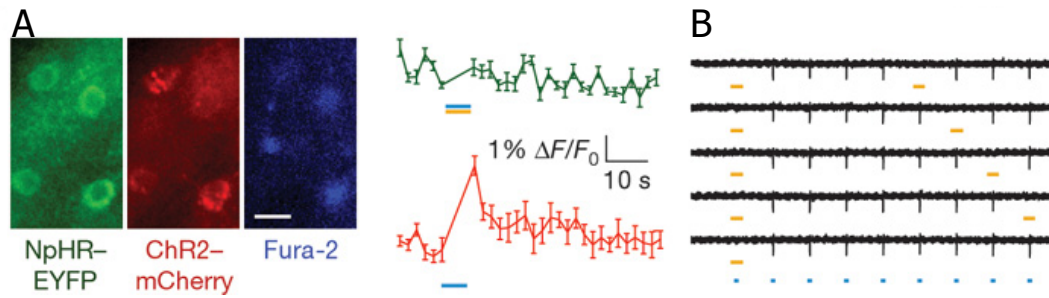


Abbildung 1.9: In **A** sind Epifluoreszenzaufnahmen von kortikalen Neuronen der Maus in denen HR-eYFP mit einem EF1 α Promotor und C2-mCherry mit einem CaMKII α Promotor in den gleichen Neuronen exprimiert wurden. Fura-2 fungiert als optischer Sensor. Das gleichzeitige Applizieren von 15 ms Lichtpulsen mit 590 und 470 nm führen zu keiner Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ (grüne Fluoreszenzspur). Die durch HR induzierte Hyperpolarisation bei 590 nm wird durch den von C2 bedingten, depolarisierenden Photostrom bei 470 nm kompensiert. Bei separater Belichtung mit 470 nm steigt $[Ca^{2+}]_i$ an (rote Fluoreszenzspur). Hierbei erfolgt der Influx von Ca^{2+} vorwiegend durch spannungsabhängige Kalziumkanäle und nicht durch C2 (siehe Text) **B** illustriert eine Cell-attached Messung an kortikalen Neuronen, in der selektiv durch 470 nm APs ausgelöst werden und bei zeitgleichem Applizieren von 590 nm Pulsen APs inhibiert werden. (verändert nach Zhang *et al.* [70])

Der lichtgesteuerte Herzschrittmacher

Der Herzmuskel besteht aus $\sim 6 \cdot 10^9$ Kardiomyozyten, die über elektrische Synapsen miteinander verbunden sind [5]. Der Tonus des Herzmuskels wird durch ein Oszillieren der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration in den Kardiomyozyten bedingt. Über spannungsabhängige L-Typ Kalziumkanäle fließt extrazelluläres Ca^{2+} in die Zellen. Bereits bei geringen Erhöhungen der Ca^{2+} Konzentration werden die kalziumabhängigen Ryanodinrezeptoren im sarkoplasmatischen Retikulum geöffnet und das Kalziumsignal verstärkt [99].

Expression von ChRs in den Kardiomyozyten der Maus ist ausreichend, um lichtinduziert das Membranpotential zu depolarisieren und somit indirekt die intrazelluläre Ca^{2+} Konzentration zu erhöhen. Der Tonus des Herzmuskels wird so in den Takt der applizierten Lichtpulsfolge gebracht [66].

Auch in Zebrafischlarven, die aufgrund ihres transparenten Körpers ein bevorzugtes optogenetisches Modellsystem sind, konnte durch Expression von HR und C2 H134R

der Herzmuskel sehr präzise kontrolliert werden. Die Expression beider Stimulatoren erlaubte eine vollständige Kontrolle des Membranpotentials durch Licht. Dadurch konnten erstmalig verschiedene Krankheitsbilder optisch simuliert und über längere Zeit beobachtet werden [100].

In beiden Organismen mussten für die *in vivo* Untersuchungen hohe Lichtleistungen benutzt werden, um tiefer gelegenen Zellschichten zu stimulieren ($720 - 1\,600\text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$). Auch hier sind längerwellige und gut exprimierende ChRs vorteilhaft. Um ein Erwärmen des Gewebes durch die hohe Lichtleistung zu verringern, wären lichtsensitivere ChRs erstrebenswert.

Visuelle Prothetik

Unter dem Sammelbegriff *Retinitis pigmentosa* (RP) verbergen sich viele verschiedene Augenkrankheiten, die aber ein Absterben der lichtsensitiven Zellen gemeinsam haben und zur Erblindung führen. Für diese Krankheiten gibt es bisher keine Therapien.

Die gesunden Zäpfchen- und Stäbchenzellen transformieren die Lichtabsorption am Rhodopsin mittels einer chemischen Signalkaskade in eine Hyperpolarisation des Membranpotentials. Die nachgeschalteten horizontalen und bipolaren Zellen wandeln die Hyperpolarisation in eine Folge von APs um. Durch anschließende komplexe, mehrschichtige Mikroverschaltung in den Retinal Ganglion Zellen (RGC) wird das Sehsignal vorprozessiert, um dann schlussendlich im visuellen Kortex verarbeitet zu werden.

Der optogenetische Ansatz versucht nach dem Absterben der lichtsensitiven Zäpfchen und Stäbchen, die nachgeschalteten Zellen durch Expression von ChRs lichtsensitiv zu machen. Dadurch könnten die natürlichen Mikroverschaltungen zum Vorprozessieren des Sehsignals weiterhin genutzt werden [101].

Im Jahre 2006 wurde C2 in *ON* und *OFF* bipolaren Zellen einer blinden Maus (*rd1/rd1* Mauslinie) exprimiert. Im Verhaltensexperiment konnte keine Verbesserung der C2-positiven Mäuse im Vergleich zu den C2-negativen Mäusen festgestellt werden. Dennoch konnten in C2-positiven Mäusen visuell evozierte Potentiale in der Sehrinde

abgeleitet und somit demonstriert werden, dass eine intakte Signalweiterleitung von der Retina bis zum Gehirn weiterhin besteht [102, 103]. Die Expression war für ≥ 12 Monate stabil [104]. In einer nachfolgenden Studie der Arbeitsgruppe um B. Roska gelang es, C2 spezifisch in *ON* bipolare Neuronen zu exprimieren. In diesem Ansatz konnten neben den C2 vermittelten Potentialen in der Sehrinde auch signifikante, lichtabhängige Verhaltensänderungen in der C2-positiven Mauspopulation festgestellt werden [105]. Bei einigen RP Erkrankungen bleibt der nicht lichtensitive Zellkörper der abgestorbenen Zäpfchen und Stäbchen erhalten. Um die komplette Mikroverschaltung des primären Sehvorganges auszunutzen, wurde HR als hyperpolarisierender Stimulator in diese übrig gebliebenen Zellkörper exprimiert. Dadurch konnten Verschaltungen wie zum Beispiel die laterale Inhibition vollständig rekonstruiert werden. Die HR positiven Mäuse zeigten im Licht-Dunkel-Verhaltensexperiment *wt* Reaktionen [65].

Gesetzliche Auflagen regulieren, welche Lichtintensitäten ins menschliche Augen appliziert werden dürfen. Je längerwelliger das Licht ist, desto höhere Intensitäten sind erlaubt [106]. Daher wären auch hier längerwellige oder lichtsensitivere ChRs vorteilhaft. Die Experimente mit HR verdeutlichen das Potential einer optogenetischen visuellen Prothetik und lassen gleichzeitig erkennen, wie erwünscht ein hyperpolarisierendes ChR ist.

Ionenkanalassay

Viele Ionenkanäle stehen direkt oder indirekt mit Krankheiten wie beispielsweise Mukoviszidose, Epilepsie oder dem QT-Syndrom im Zusammenhang [107]. Daher zeigt die Pharmaindustrie auch ein reges Interesse an Hochdurchsatzsystemen, um potentielle Wirkstoffe gegen Ionenkanäle zu testen. Bestehende Systeme wie herkömmliches Patch-Clamp, planares Patch-Clamp oder das Rubidiumionen Efflux Assay können nur schwer auf hohe Durchsätze optimiert werden beziehungsweise das Membranpotential ist nicht ausreichend kontrollierbar.

Optogenetische Stimulatoren wie ChRs, LiGluR oder HR sind interessante Werkzeuge zur Entwicklung von Hochdurchsatzsystemen, in denen das Membranpotential optisch

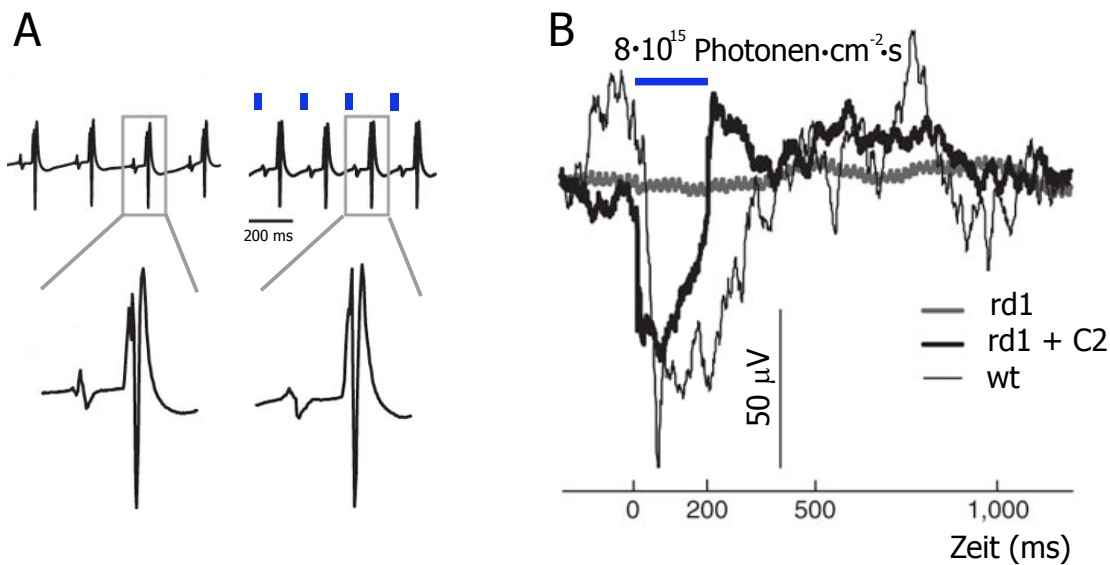


Abbildung 1.10: Zeigt Anwendungen optogenetischer Stimulatoren an der Maus. In **A** ist das Elektrokardiogramm (EKG) eines natürlich schlagenden Herzmuskels gezeigt (*links*). Durch Expression von C2 in Kardiomyozyten mittels eines *CAG* Promotors kann ein stillgelegter Herzmuskel mittels 10 ms Lichtpulse auf eine 38 mm 2 großen Stimulationfläche wieder zum Kontrahieren gebracht werden (*rechts*). Die P-Welle und der QRS Komplex des EKGs zeigen nur geringe Abweichungen im Vergleich zum natürlich schlagenden Herzen. **B** zeigt lokale Feldpotentialmessungen (LFP) im visuellen Kortex der Maus. Zielgerichtete Expression von C2 mittels des *Grm6* Promotors in ON bipolaren Neuronen von *rd1* Mäusen zeigt in LFP Messungen ähnliche Potentiale wie bei *wt* Mäusen evoziert (verändert nach Brüggmann *et al.* und Lagali *et al.* [66, 105]).

geklemt wird [69]. ChRs mit verschiedenen Spektren wären wünschenswert, um eine spektrale Überlappung mit den verschiedensten optischen Sensoren zu vermeiden.

Aus den aufgeführten Beispielen können zusammenfassend einige Optimierungsmöglichkeiten für ChRs aufgelistet werden:

- Erhöhung der Einzelkanalleitfähigkeit
- Verbesserung der Expression und Membranintegration
- Höhere Ionenselektivitäten

- Einführen einer Chloridleitfähigkeit
 - Erhöhen der Kaliumleitfähigkeit
 - Erhöhen der Kalziumleitfähigkeit
 - Erhöhen der Natriumleitfähigkeit
 - Verringern oder Erhöhen der Protonenleitfähigkeit
-
- Verschiebung zu längerwelligeren Absorptionen
 - Verschiebung zu kürzerwelligeren Absorptionen
 - Verringerung der Breite des Absorptionsspektrums
 - Beschleunigung und Verlangsamung der Kinetiken
 - Verringerung der Inaktivierung
 - Erhöhung der Quanteneffizienz und Absorption

1.4 Bekannte anwendungsbezogene Optimierungen von Kanalrhodopsinen

1.4.1 Kinetische Veränderungen

Viele in ChRs eingeführte Mutationen beruhen auf homologen, gut beschriebenen Mutationen im BR [108, 97, 58, 109]. Die Aminosäuren D85 und D96 werden im BR jeweils als Protonierungs- beziehungsweise Reprotonierungspositionen beschrieben [29]. Die homologen Positionen im C2 sind E123 und H134. Die Mutation C2 H134R zeigt eine kleine Inaktivierung bei einem 1.5 – 2 x höheren Photostrom [91, 110]. Bei der Bestimmung der Einzelkanalleitfähigkeit durch stationäre Rauschanalyse konnte aber keine höhere Leitfähigkeit für C2 H134R festgestellt werden [34]. Die vergrößerte Photostromamplitude ist wohl eher auf eine bessere Expression oder Membranintegration zurückzuführen. Der τ_{Abk} verlangsamt sich bei C2 H134R um Faktor ~ 1.5 x im Vergleich zu C2 auf 26 ms [20]. Die Mutation besitzt, wie bereits erwähnt, auch ein kleineres

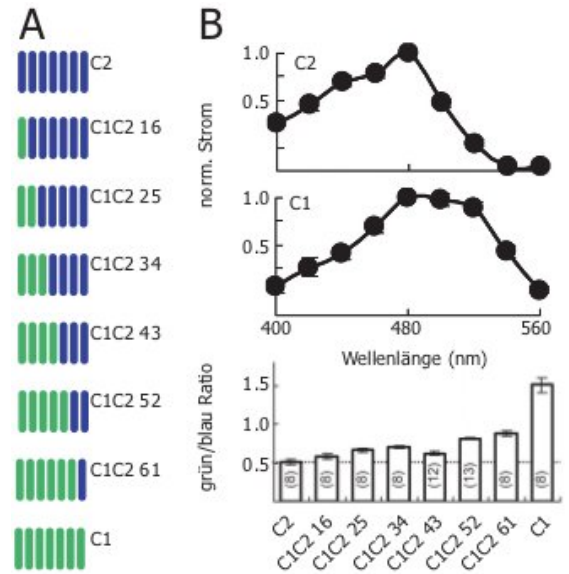
Verhältnis von P_{H^+}/P_{Na^+} [55].

Bereits 2002 konnte der Einfluss der Position C2 E123 in Helix B auf das Gleichgewicht zwischen D470 und Des480 gezeigt werden [19]. Eine genauere Untersuchung 8 Jahre später zeigte, dass die Mutationen E123T/A/Q den τ_{Abk} um ~ 2 x beschleunigen. Gleichzeitig wird der Des480 Zustand nur für kürzere Zeit im Vergleich zum *wt* bevölkert und τ_{Errk} beschleunigt sich daher auf ~ 2 s bei negativen Membranspannungen [97]. Die Mutationen C2 E123T und E123Q verschieben das Aktionsspektrum auf ~ 490 nm. Insbesondere die Mutation C2 E123T fand in der Optogenetik Anwendung und ist unter der Bezeichnung ChETA bekannt (*ChR ET* Austausch)

Unabhängig voneinander entwickelten drei Arbeitsgruppen eine ChR-Chimäre, die aus den ersten 5 Helices von C1 und den letzten beiden aus C2 besteht [46, 111, 58]. Der Photostrom dieser sogenannten C1C2-52 Chimäre ist ~ 2 x höher als der von C2 und besitzt das schnelle und schwache Inaktivierungsverhalten von C1. Der τ_{Abk} ist dabei leicht verlangsamt (~ 20 ms) und kann durch die BR homologe Mutation I170V auf 10 ms und somit wieder in die Nähe des τ_{Abk} von C1 beschleunigt werden [58].

Auch Varianten mit langsamer Kinetik sind für die optogenetischen Anwendungen von Interesse. Hierfür wurden verschiedene Aminosäuren im Reprotonierungsnetzwerk der *RSB* verändert. Die Positionen C128 und D156 in C2 spielen hierbei eine herausragende Rolle [112]. Die Mutationen C128T/A/S besitzen je einen τ_{Abk} von 2, 50 und 100 s und sind somit bis zu 10 000 x langsamer als der C2 *wt* [108]. Die Mutation C2 D156A verlangsamt den τ_{Abk} sogar auf ≥ 150 s [109]. Mutationen an diesen beiden Positionen wurden als *Step Function Rhodopsin* (SFR) bezeichnet. Die Kombination beider Mutanten zu C2 C128S/D156A führen zu einem τ_{Abk} von ~ 30 min und wurden daher folgerichtig auch als *Slow SFR* (SSFR) titulierte. Durch den stark verlangsamen Übergang zwischen P520 zu P480 besitzen die SFRs sowie das SSFR eine längere Verweildauer im Gleichgewicht zwischen P390 und P520 und sind daher auch entsprechend länger geöffnet. Die sich in P390 und P520 befindenen ChR* können photochemisch durch Licht einer Wellenlänge von ~ 405 und ~ 590 nm direkt in Des480 überführt und somit quasi ausgeschaltet werden (siehe Abbildung 1.8). Da diese ChR

Abbildung 1.11: Zeigt eine Studie aus der Arbeitsgruppe um H. Yawo, in der einzelne Helices von C2 sukzessive gegen die jeweils entsprechenden von C1 ausgetauscht wurden. In **A** sind die entsprechenden Konstrukte symbolisiert und mit ihrer entsprechenden Bezeichnung gekennzeichnet (*Bezeichnung angepasst*). In den oberen beiden Graphen von **B** sind jeweils die normalisierten Wellenlängenabhängigkeiten von C1 und C2 gezeigt. In dem unteren Graphen von **B** sind die Verhältnisse der summierten Photostromamplituden von 440 – 460 nm und 500 – 520 nm für alle Chimären gezeigt. Die gestrichelte Linie gibt das grün/blau Verhältnis für C2 als Vergleichswert an (verändert nach Wang *et. al*) [111].



Mutanten also mit Licht an- und ausgeschaltet werden können, bezeichnet man sie als SFRs. Eine weitere Besonderheit der SFRs ist die scheinbar erhöhte Lichtsensitivität. Durch Verlängern eines Lichtpulses mit schwacher Intensität können bei SFRs nämlich gleiche Photostromamplituden wie bei C2 *w* exprimierenden Zellen bei einem kurzen starken Puls erzielt werden. Die geringe Anzahl des Photonenflusses bei schwacher Belichtung wird hier durch die verlängerte Pulsdauer ausgeglichen. Die SFRs integrieren somit den Photonenfluss bis alle ChRs angeregt sind und der maximale Photostrom erreicht ist. Hierbei ist die Photonintegration nur für den Dauer des Photozyklus möglich. Bei wiederholter Anregung der SFRs nehmen die Photostromamplituden ab [113]. Ein Phänomen, was spektroskopisch durch eine Verzweigung beim P480 Intermediat in ein geschlossenes, nicht aktivierbares P380 Intermediat erklärt wurde. Dieses Intermediat relaxiert innerhalb von einigen Minuten in den D470 Zustand zurück [114].

1.4.2 Spektrale Veränderungen

Unter sauren Bedingungen besitzt C1 einen λ_{max} bei 500 nm. Des Weiteren weißt C1 eine schnelleren τ_{Abk} und geringere Inaktivierung auf. Diese Eigenschaften haben Vorteile in der optogenetischen Anwendung. Die Arbeitsgruppe um H. Yawo tauschte

sukzessive die Helices von C2 gegen die homologen von C1 aus um die Determinanten für die unterschiedlichen Eigenschaften zu bestimmen (siehe Abbildung 1.11 **A**). Das Aktionsspektrum konnte am deutlichsten durch hinzufügen der C1 Helices E und F erzielt werden. Kleinere Unterschiede konnten auch in Helices C und D detektiert werden (siehe Abbildung 1.11 **B unten**). Eine Mutationsanalyse in Helix E identifizierte die Aminosäure C2 N187 als Schlüsselposition. Der Austausch zum C1 homologen Tyr erhöht das grün/blau Verhältnis und nähert es somit auf $\sim 90\%$ des C1 Wertes an. In einer weiterführenden Studie im Jahre 2010 tauschte die gleiche Arbeitsgruppe die Helix F von C1 gegen das Pendant von C2 aus. Das so generierte Konstrukt C1C2-511 besitzt einen erhöhten Photostrom und das verbreiterte Absorptionsspektrum von C1. Ausgehend von diesem Konstrukt wurde zusätzlich die Aminosäuresequenz nach dem retinalbindenden Lys (K296) mit der entsprechenden Sequenz von C2 ausgetauscht. Dadurch erhöhte sich der Photostrom auf das ~ 7 x von C1 bei gleichbleibenden Absorptionseigenschaften [115]. Die Kanalrhodopsinvariante wurde als *Greenreciever* bezeichnet.

Das vom pH-Wert abhängige Verschieben des Aktionsspektrums von C1 konnte zum größten Teil auf die Aminosäure C1 E87 zurückgeführt werden [46].

Die bereits im Kinetik Abschnitt von 1.4.1 diskutierte ChETA Mutation war neben den C1C2 Chimären aus Abbildung 1.11 **B**, bis zu Beginn der vorliegenden Arbeit, die einzigen rotverschobene Kanalrhodopsinvariante.

1.4.3 Chimäre Kanalrhodopsine

Wie bereits in den vorherigen Abschnitten erwähnt, haben neben den auf einzelnen Mutationen beruhenden Kanalrhodopsinvarianten auch chimäre Varianten eine besonders herausragende Rolle. Das Austauschen von einzelnen Helices zwischen C1 und C2 wurde durch die Hoffnung getrieben positive Eigenschaften des jeweiligen ChRs in einer Variante zu vereinen. Eher beiläufig stellte sich heraus, dass die Chimäre C1C2-52 einen ~ 1.5 x höheren Photostrom besitzt [46, 58, 111]. In der Studie von Yawo *et al.* konnte mittels quantitativer Fluoreszenzmessung gezeigt werden, dass diese Erhöhung des Photostroms auf eine verbesserte Membranständigkeit zurückzuführen ist [111].

Interessanterweise zeigten nur die Chimären eine Aktivität die mit einem C1 N-Terminus begannen.

2 Zielstellung

Die zielgerichtete Entwicklung von effizienten und farbverschobenen ChRs für die Optogenetik ist eng verbunden mit dem Verständnis für die mechanistischen Phänomene der ChRs. Um diese Phänomene besser beschreiben zu können, sollten elektrophysiologische Untersuchungen an ChRs in HEK Zellen durchgeführt werden. Hierfür war es nötig, die Patch-Clamp Methode und die eukaryotische Zellkultur in der AG Hegemann zu etablieren. Beide Methoden sollten hinsichtlich einer ChR Anwendung optimiert werden. Hierbei sollte besonders auf flexible Belichtungssysteme geachtet werden, die es ermöglichen, die verschiedenen spezifischen ChR-Parameter wie maximale Absorption, Anstiegskinetik und Abklingkinetiken mit hoher Genauigkeit zu bestimmen. Dabei wurde nicht nur eine hohe zeitliche Auflösung für die Belichtungssysteme verlangt, sondern auch für die eigentliche elektrophysiologische Messung. Durch eine von Yawo *et al.* inspirierte Helixaustausch-Strategie sollte anschließend versucht werden, funktional interessante Abschnitte in den Aminosäuresequenzen der ChRs aufzufinden. Ein anschließender gezielter Austausch von einzelnen Aminosäuren in den identifizierten Sequenzabschnitten sollte erste Struktur-Funktionszusammenhänge für die junge Familie der lichtgesteuerten Ionenkanäle liefern. Auf Grundlage solcher Zusammenhänge sollten dann die gezielten Veränderungen in den Primärsequenzen der ChRs zu längerwelligen und gut exprimierenden Varianten führen. Auch in Hinblick auf neue ChR-Varianten mit unterschiedlichen Absorptionseigenschaften sollte untersucht werden, inwieweit eine Kombination mit ionen-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen möglich ist, um zelluläre Reaktionen optisch zu detektieren.

3 Material und Methoden

3.1 Molekularbiologie

3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient dem Vervielfältigen einzelner DNS-Abschnitte. Sie wurde benutzt, um die einzelne DNS-Fragmente entweder zu verbinden (Überlappungs-PCR), um ihnen flankierende Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen (REN) hinzuzufügen oder um einzelne Fragmente zu überprüfen. Die PCR Ansätze bestanden aus 50 μl und setzten sich wie folgt zusammen:

0.5 - 2	μl	Ausgangs-DNS	25 - 50	$ng/\mu l$	
5	μl	Puffer			Reprofast / Phusion
5	μl	Desoxynukleotid Mix	25	mM	NEB
1	μl	Polymerase			Reprofast / Phusion
1	μl	Vorwärtsstartersequenz	10	μM	Sigma
1	μl	Rückwärtsstartersequenz	10	μM	Sigma
x	μl	aufgefüllt mit ddH_2O			

Die Anlagerungstemperaturen für die jeweiligen Startersequenzen wurde aus dem jeweiligen Datenblatt übernommen und betrug in der Regel 60 $^{\circ}C$. Die Dauer des Vervielfältigungszyklus berechnete sich aus einer angenommenen Polymerasegeschwindigkeit von 1 $kb \cdot min^{-1}$. Der Zyklus wurde in der Regel 25 x wiederholt. Das 1 %ige Agarosegel mit 0.5 $\mu g \cdot ml^{-1}$ Ethidiumbromid diente dem Auftrennen der DNS-Fragmente mittels Gelelektrophorese und anschließender

Visualisierung mittels UV-Licht. Die DNS wurde durch ein Aufreinigungssystem (NucleoSpin Extract II, Macherey Nagel) laut Anleitung des Herstellers aus dem Agarosegel aufgereinigt.

3.1.2 Restriktionsverdau der DNS

Zum sequenzspezifischen Schneiden der DNS wurden die jeweiligen REN mittels der GENTle-Software bestimmt und in einen 20 μl Ansatz wie folgt zusammen gestellt:

1 - 10	μl	PCR Produkt oder Plasmid	2	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	
2	μl	Puffer			NEB / Fermentas
1	μl	REN 1	10	$\text{U}/\mu\text{l}$	NEB / Fermentas
1	μl	REN 2	10	$\text{U}/\mu\text{l}$	NEB / Fermentas
x	μl	aufgefüllt mit H_2O			

Die Inkubation des Ansatzes erfolgte bei 37°C für 0.2 - 3 h. Die anschließende Gelelektrophorese diente der Kontrolle. Aufreinigung der PCR Fragmente erfolgte bei Bedarf (siehe Abschnitt 3.1.1). Durch Zugabe von 1 μl alkalischer Phosphatase (Antarctic Phosphatase, NEB) zum Verdauungsansatz konnte sichergestellt werden, dass die naszierenden 5'-Phosphate von der Schnittstelle entfernt waren und so die Wahrscheinlichkeit einer Selbstligation des leeren Plasmides verringert wurde.

3.1.3 Ligation der DNS

Die geschnittenen PCR-Fragmente und Plasmide wurden vor der Ligation gereinigt (siehe 3.1.5). Die Bestimmung der DNS-Konzentration erfolgte durch Absorptionsmessungen bei 260 und 280 nm. Die geschnittenen Plasmide und DNS-Fragmente wurden in der Regel in einem Verhältnis von 1:3 im Ligationansatz gemischt. Der Ansatz betrug 20 μl und inkubierte für 1 h bei 18°C :

1 - 2	μl	Plasmid	30	$ng/\mu l$	
1 - 5	μl	PCR Produkt	100	$ng/\mu l$	
2	μl	Puffer			Fermentas
1	μl	T4 DNS Ligase	5	$U/\mu l$	Fermentas
x	μl	aufgefüllt mit H_2O			

3.1.4 Plasmid-Transformation

Zur Transformation wurden chemisch-kompetente XL1-Blue *Escherichia coli* Zellen mit 1 – 5 μl DNS versetzt [116]. Aufnahme der DNS erfolgte mittels Hitzeschock bei 42 °C für 2 min. Zugabe von 400 μl reinem LB-Mediums und anschließende Inkubation der Zellen bei 37 °C für 1 h unter Bewegung (600 rpm) erzielte eine hohe Transformationseffizienz. Die Selektion der transformierten Zellen erfolgte durch Auftragen des Ansatzes auf LB- Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum und anschließender Inkubation bei 37 °C ~ 16 h.

3.1.5 Aufreinigung der DNS

Die Aufreinigung der Plasmide erfolgte nach den Herstellerangaben mit einem Aufreinigungssystem (NucleoBond, Macherey Nagel oder PureYield, Promega).

3.1.6 Ortsspezifische Mutagenese

Für den ortsspezifischen Austausch einzelner DNS-Basen im jeweiligen Zielgen wurde das Quikchange Mutagenesesystem entsprechend der Herstellerangaben verwendet (QuikChange II, Agilent Technologies). Mit der firmeneigenen Software (QuikChange PrimerDesign, Agilent Technologies) konnten die degenerierten Startersequenzen effektiv konzipiert werden.

3.1.7 Sequenzierung der DNS

Zur Kontrolle der erfolgreichen Mutation beziehungsweise der jeweiligen DNS-Sequenz wurden die entsprechenden Gene vollständig sequenziert (Service Molecular Biology, Martin Meixner).

3.1.8 Verwendete Konstrukte für HEK Zellen

Ausgangsplasmid für alle Konstrukte war das pXFP-N1 (Clontech) verwendet. Das *X* steht für eine bestimmte Farbvariante des fPs [117]. Das jeweilige fP zur Markierung wurde so ausgewählt, dass die Absorptionsspektren von ChR und fP nur minimal überlappten. Das verwendete Plasmid besaß einen *Cytomegalo* Virus Promotor (CMV), um eine hohe Expression in eukaryotischen Zellen zu erzielen. Zum Selektieren besaß das Plasmid ein Kan^r/Neo^r Resistenzgen.

Ursprüngliche Kanalrhodopsine Als ursprüngliche ChRs werden die Varianten bezeichnet, die bis auf eine verkürzte Proteinsequenz keine weiteren Veränderungen zu den Wildtypgenen aus *C. reinhardtii* und *V. carteri* aufweisen. Zur besseren Expression der ChRs wurden die Gene an eine humane Kodon Präferenz angepasst (MrGene, Regensburg). Die so veränderten Konstrukte sind mit einem vorangestellten *h* gekennzeichnet.

Chimäre Kanalrhodopsine Mit Ausnahme der Konstrukte V1V2-223 und V1V2-52 wurden alle chimären ChRs mittels Überlappungs-PCR generiert.

Kanalrhodopsinfusionen mit genetisch-kodierten Kalziumsensoren Für diese Arbeit wurden FRET basierende Kalziumsensoren wie Cameleon [86] und zirkulär permutierte, monomere Varianten wie GCaMP3 [84] und RCaMP1.017 (unpubliziert von J.Akerboom/L.L.Looger) verwendet. GCaMP3 und Cameleon wurden bei 440 nm aktiviert und die Fluoreszenz bei 500 nm detektiert. RCaMP1.017 konnte bei 560

Name	Klonierung	Farbstoff	Protein	NCBI ID
C1	BamHI/HindIII	eGFP	346	AF385748
hC1	NheI/BamHI	eCFP	356	n.a
C2	HindIII/BamHI	eGFP	318	AF461397
hC2	BamHI/XbaI	mCherry	309	EU714030
	HindIII/BamHI	eCFP	328	
	HindIII/BamHI	Venus	328	
hV1	BamHI/SplI	mCherry	324	n.a
	XhoI/BamHI	eCFP	323	
hV2	HindIII/BamHI	eGFP	308	n.a

Tabelle 3.1: Listet alle ursprünglichen ChRs mit ihren jeweilig verwendeten Fluorophoren auf. Die humanisierten Sequenzen wurden in den Datenbanken vom Nationalen Zentrum für biologische Informationen veröffentlicht (NCBI).

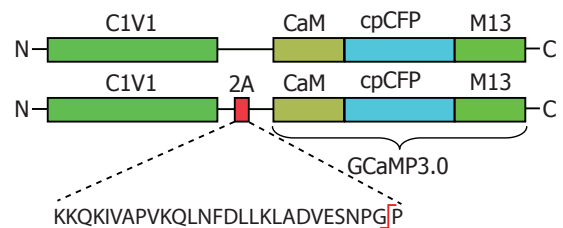
Name	Klonierung	Farbstoff	V1	V2	C1	C2
V2V1-25	XbaI/BamHI	eCFP	140-315	1-139		
V2V1-43	XbaI/BamHI	eCFP	160-315	1-159		
V2V1-52	XbaI/BamHI	eCFP	200-315	1-199		
V2V1-61	XbaI/BamHI	eCFP	242-315	1-241		
V1V2-133	XbaI/BamHI	eCFP	1-57/194-315	58-193		
V1V2-223	XbaI/BamHI	eCFP	1-101/169-315	102-168		
V1V2-223	HindIII/BamHI	eGFP	1-101/169-315	102-168		
V1V2-25	XbaI/BamHI	eCFP	1-126	127-308		
V1V2-322	XbaI/BamHI	eCFP	1-122/228-315	123-227		
V1V2-421	XbaI/BamHI	eCFP	1-166/240-315	167-239		
V1V2-52	XbaI/BamHI	eCFP	1-205	206-308		
V1V2-52	HindIII/BamHI	eGFP	1-205	206-308		
V1C2-223	XhoI/BamHI	eCFP	1-101/170-323	106-173		
C2V1-43	XbaI/BamHI	eCFP	170-327			1-173
C1V1-52	XbaI/BamHI	eCFP	205-315		1-249	
C1V1-25	XbaI/BamHI	eCFP	102-315		1-146	
C1V1-25	XbaI/BamHI	mCherry	102-315		1-146	

Tabelle 3.2: Listet die jeweiligen chimären ChRs mit den entsprechenden Fluorophoren auf.

nm anregt und das Fluoreszenzsignal bei $590\ nm$ detektiert werden (HCTriBand Filtersystem).

Die Kombination der Sensoren mit den ChRs erfolgte mit dem Ziel, die jeweilige Ko-Anregung so gering wie möglich zu halten. Entweder wurden die Sensoren direkt

Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der C1V1-25 Chimäre in Fusion mit GCaMP3. In der unteren Abbildung erlaubt das 2A – Peptid eine separate Expression beider Proteine. Durch eine bestimmte Faltung des 2A- Peptides während der Translation wird verhindert, dass sich zwischen dem Gly und Pro eine Peptidbindung ausbildet.



mit den ChRs fusioniert oder als zwei getrennte Proteine exprimiert. Für die getrennte Expression fand das 2A-Peptid vom Virus der Maul- und Klauenseuche Verwendung. Dieses Peptid dient in eukaryotischen Zellen als neuartiges und einfaches bizistronisches System. Das Faltungsmotiv des Peptids verhindert das Bilden einer Peptidbindung zwischen dem Gly und Pro. Der angelagerte Ribosomenkomplex bleibt dabei aktiv und beginnt das zweite, nun separate Protein, zu translatieren [118].

Name	Klonierung	Länge ChR	Linker	2A	Farbstoff
C1V1-25 Cameleon	BamHI/XbaI	360	3	0	440
C1V1-25 2A Cameleon	BamHI/XbaI	360	3	29	440
C1V1-25 GCaMP3	BamHI/XbaI	360	7	0	440
C1V1-25 2A GCaMP3	BamHI/XbaI	360	0	29	440
C2 T159C RCaMP1.017	HindIII/XbaI	309	6	0	407
C2 T159C-L1-RCaMP1.017	HindIII/XbaI	309	8	0	407
C2 T159C-L2-RCaMP1.017	HindIII/XbaI	309	16	0	407
C2 T159C-L3-RCaMP1.017	HindIII/XbaI	309	24	0	407
C2 T159C-2A-RCaMP1.017	HindIII/XbaI	309	0	29	407

Tabelle 3.3: Fasst die verschiedenen Fusionsproteine von ChRs und Kalziumsensor zusammen.

3.2 Etablierung von zellkulturbezogenen Arbeitstechniken

Mit Unterstützung von Thomas Pomorski, Susanne Hanisch und Gabi Reincke führten wir die eukaryotische Zellkultur in der AG Hegemann ein.

3.2.1 Kultivierung von HEK Zellen

Medien und Kultivierung Die verwendeten HEK Zellen wurden bei 37°C unter 5 % CO_2 Atmosphäre kultiviert. Die Pflege der Zellen erfolgte unter Dulbeccos minimalem essentiellen Medium mit stabilem Glutamin (DMEM, FG0415, Biochrome). Dem Medium wurde 10 % fetales Kälberserum (FKS, S0415, Biochrom) und 1% Penicillin und Streptomycin (A2212, Biochrom) hinzugefügt.

Die Zellen wurden 2 x wöchentlich passagiert und in der Regel bis zur 30. Passage verwendet. Die folgenden Schritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Passagieren Nach zweimaligem Waschen der Zellen in phosphatgepufferter Salzlösung ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} (PBS, L1825, Biochrom) wurden 0.5 ml einer 0.05 %/0,02 % Trypsin/EDTA-Lösung auf die adherenten Zellen getropft. Nachdem die Zellen anfangen, sich abzulösen ($\sim 1 \text{ min}$), konnte durch Zugabe von kalziumhaltigem DME Medium die Proteasereaktion gestoppt werden. Die Zellen wurden in ein 15 ml Plastikröhrchen überführt und bei 500 g für 3 min zentrifugiert (Hettich, Universal 30 RF, Rotor 1424A). Das überstehende Medium wurde anschließend gegen 3 ml frisches DME Medium ausgetauscht. Die Zellkonzentration wurde mittels einer Neubauerzählkammer ($0.1 \text{ mm} \times 0.0025 \text{ mm}^2$, Brand) unter einem Telaval Mikroskop (Televal 31, Carl Zeiss) mit 20 x / 0.35 Achromat LD (Zeiss) bestimmt. In jeder T25-Zellkulturflasche waren $\sim 0.1 \cdot 10^5 \text{ Zellen} \cdot \text{ml}^{-1}$ angesetzt.

Einfrieren und Auftauen Die Zellen wurden beim Einfrieren analog wie bei beim Passagieren behandelt (siehe Abschnitt 3.2.1). Nach der Zentrifugation wurden die Zellen allerdings in einer Konzentration von $1 \cdot 10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{ml}^{-1}$ im Einfriermedium (50 % DMEM, 30 % FKS, 20 % DMSO) aufgenommen und je 1.8 ml in ein Kryoröhrchen gefüllt. Durch vorsichtiges, schrittweises Herunterkühlen der Zellen auf -80°C mit einer isopropanolhaltigen Eisbox können die Zellen für mindestens 2 Jahren haltbar gemacht

werden.

Zum Auftauen wurden die noch gefrorenen Zellen in $\sim 12\text{ ml}$ vorgewärmtes Vollmedium gelöst. Um das DMSO-haltige Einfriermedium komplett zu entfernen, mussten die Zellen bei 500 g pelletiert und dann in frischem Vollmedium aufgenommen werden. Die anschließend in 5 ml resuspendierten Zellen wurden in eine T25 Zellkulturflasche ausgesät.

Vorbereiten der Zellen für elektrophysiologische Messungen Um die Zellen für elektrophysiologische Messungen vorzubereiten, wurden sie auf 15 mm Deckgläsern ausgesät (1001/15, Hecht-Assistent). Dafür wurden die Zellen wie beim Passagieren behandelt und nach der Zentrifugation in einer Konzentration von $1.25 \times 10^5\text{ Zellen}\cdot\text{ml}^{-1}$ im Vollmedium resuspendiert. In einer 35 mm Petrischale (Zellkulturschalen, TPP) mit je 2 unbehandelten, autoklavierten 15 mm Deckgläsern wurden 2 ml der Zellsuspension ausgesät. Die Endkonzentration vom *all-trans* Retinal (R2500, SigmaAldrich) betrug bei Messungen mit Rhodopsinen $1\text{ }\mu\text{M}$, die der ethanolhaltigen Stammlösung 1 mM .

3.2.2 Transfektion von HEK Zellen

Bei der Transfektion von HEK Zellen wurden verschiedene Transfektionsmethoden und dabei unterschiedliche Transfektionsreagenzien getestet. Für Patch-Clamp Messungen wurde meist eine Lipofektion durchgeführt. Nach einer zeitlich unbestimmten Testphase fanden ausschließlich FugeneHD (E2311, Roche) oder TransPassTM COS/293 (M2557S, NEB) Anwendung.

Lipofektion Die Transfektion wurde laut Herstellerangaben durchgeführt. Eine DNS Konzentration von $2\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{Petrischale}^{-1}$ erzielte die höchste Transfektionseffizienz. Die Messung erfolgte in der Regel nach $24 - 48\text{ h}$.

Induktion der stabilen Zelllinie Die induzierbare und stabile ChR2-Zelllinie basiert auf dem Tetrazyklone-induzierten Promotersystem Tet-on (K1020-01, Life Technologies). Zur

Induktion der Expression wurde das alte DME Medium gegen frisches DMEM + 0.1 μM Tetrazyklin ausgetauscht. Nach 24 *h* wurden die Messungen durchgeführt.

3.2.3 Vorbereiten der Zellen zur zeitaufgelösten Fluoreszenzmessung

Um Änderungen der intrazellulären Ionenkonzentration optisch zu detektieren, fanden ionensensitive Fluoreszenzfarbstoffe Anwendung. Die geladenen funktionellen Gruppen der Farbstoffe sind durch Azetomethylester (AM) maskiert. Dadurch kann der so veränderte, nun hydrophobe Farbstoff, durch die Zellmembran diffundieren. Endogene Esterasen spalten den Azetomethylester im Zellinneren ab und setzen den funktionellen Farbstoff frei. Da bei dieser enzymatischen Reaktion H^+ -Ionen frei werden, säuert sich das Zytoplasma kurzzeitig an und bei einer zu starken Beladung sterben die Zellen ab [119].

Beladen der Zellen mit ionensensitiven Fluoreszenzfarbstoffen Der jeweilige Farbstoff wurde in DMSO (472301, SigmaAldrich) zu 1 *mM* gelöst. Das DME Vollmedium der Zellen wurde durch 1 *ml* einer 2 – 4 μM AM-Farbstoff/DME Lösung ersetzt. Nach Inkubation bei 37 °C für 20 *min* unter 5 % CO₂ Atmosphäre wurden die Zellen mit hyperpolarisierendem, niedrig dosiertem Kaliumpuffer gewaschen und für die Dauer weiterer 10 *min* inkubiert, um eine komplette Hydrolyse des Azetomethylesters zu ermöglichen. Danach konnten die Zellen direkt für die Fluoreszenzmessung verwendet werden.

Verwendete Farbstoffe Die in Tabelle 3.4 aufgelisteten Farbstoffe wurden hinsichtlich Beladung, Ko-Anregung und Sensitivität getestet. In dieser Arbeit werden vorwiegend Experimente mit Fura2 präsentiert.

3.2.4 Verwendete eukaryotische Zelllinien

Die in der Tabelle 3.5 aufgeführten eukaryotischen Zelllinien fanden in dieser Arbeit Verwendung. Die Angabe des jeweiligen Antibiotikums bezieht sich auf die

Name	Ionen	Exzitation [nm]	Emission [nm]	Firma
Fura2	Ca^{2+}	340/380	510	Life Technologies (F-1221)
BCECF	H^+	440/490	535	Life Technologies (B-1150)
Fluo4	Ca^{2+}	490	520	Life Technologies (M-14206)
X-rhod	Ca^{2+}	550	600	Life Technologies (X-14210)
SNARF	H^+	570	630	Life Technologies (C-1272)
Crimson	Ca^{2+}	590	630	Life Technologies (C-3018)

Tabelle 3.4: Listet die verwendeten AM-Farbstoffe mit ihrer maximalen Exzitation- und Emissionswellenlängen auf.

Endkonzentration im Medium. Neben den aufgeführten Antibiotika enthielten die Medien der Zelllinien immer auch 1 % Penicillin /Streptomycin Lösung.

Zelllinie	Antibiotikum ($\mu g/ml$)	Besonderheit
HEK293	/	DSMZ ACC305
T-Rex	5 Blastizidin	Invitrogen R710-07
mTreK	0.4 Puromycin und 400 G418	von P. Q. Baretta [120]
HEK-ChR2-YFP	200 Zeozin und 50 Blastizidin	von E. Bamberg [30]

Tabelle 3.5: Fasst die verwendeten HEK Zelllinien mit entsprechender Konzentration der notwendigen Antibiotika zusammen.

3.3 Elektrophysiologische Messungen

Zur umfassenden elektrophysiologischen Charakterisierung von ChRs fanden verschiedene elektrophysiologische Methoden Anwendung. Alle hierfür notwendigen Messapparaturen wurden für die Versuchsreihen der hier vorliegenden Arbeit neu aufgebaut und etabliert. Unterstützend begleiteten diese Phase P. Berthold und R. Hagedorn.

3.3.1 Messungen mit Saugelektroden an *Chlamydomonas reinhardtii*

Herr H. Harz etablierte 1992 während seiner Promotion die Saugelektrodenmessung an *C.reinhardtii* [53, 7]. J. Braun verbesserte diese Methode und wendete sie erstmalig auf vereinzelte vegetative Kolonien von *V.carteri* an [11]. Der Aufbau der Messapparatur sowie die Durchführung der jeweiligen Experimente erfolgte nach den beschriebenen Anleitungen von H. Harz und J. Braun.

3.3.2 Zwei-Elektrodenmessungen an *Xenopus laevis* Oozyten

Um die immanente Anstiegs- und Abklingkinetik der ChRs zu bestimmen, werden sehr kurze und intensive Lichtpulse benötigt. Mit Unterstützung von R. Hagedorn konnte eine Apparatur zur Zwei-Elektroden-Spannungsklemme mit einem durchstimmbaren Nanosekundenlaser (Rainbow OPO, OPOTEK) aufgebaut werden. Der verwendete Laser verfügte über eine Nd:YAG Pumpquelle, die durch Frequenzverdopplung und -verdreifachung auf 532 beziehungsweise 355 nm transformiert werden konnte. Durch einen optisch parametrischen Oszillator (OPO) konnte der Laserstrahl in eine beliebige Wellenlänge zwischen 340 – 680 nm umgewandelt werden (siehe Abbildung 3.2 A). Die spektrale Halbwertsbreite betrug dabei ~ 10 nm, die temporale lag bei minimal ~ 6 ns (siehe Abbildung 3.3). Die Pumpfrequenz des Nd:YAG Lasers betrug 10 Hz. Um den Laser mit der Messapparatur zu synchronisieren, musste ein 5 V TTL Puls ~ 270 μ s vor dem nächsten Pumpuls mittels der pClamp-Software zum Q-Switch des Laser gesendet werden (siehe Abbildung 3.2 B).

S. Tsunoda injizierte mRNA in die Oozyten und führte die eigentlichen elektrophysiologischen Messungen an dieser Apparatur durch [31, 121]. Die aus solchen Messungen bestimmte immanente Abklingkinetik ($\tau_{Abk,ima}$) kann ausreichend genau mit einer monoexponentiellen Funktion angenähert werden.

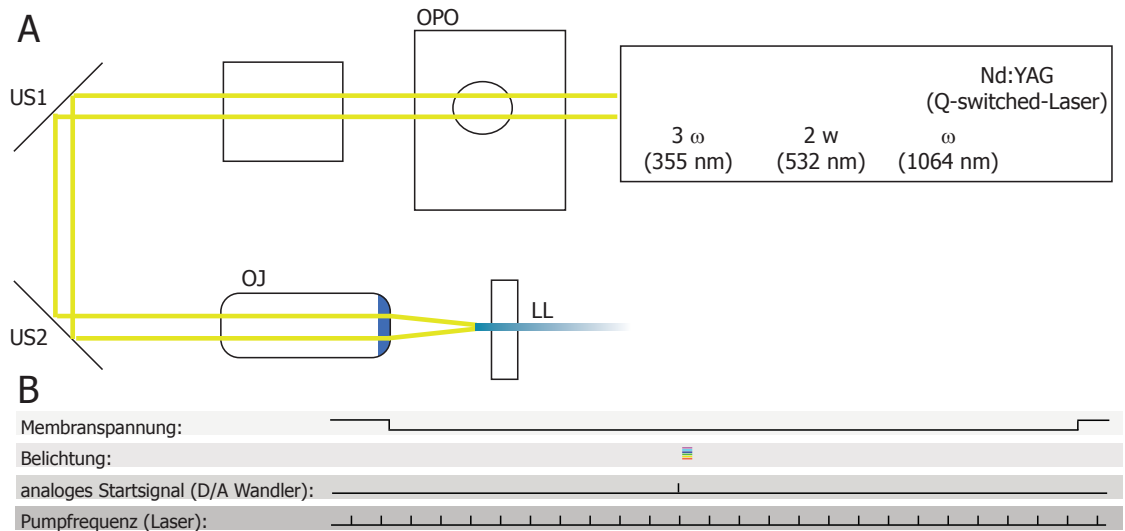


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des Laseraufbaus und der Messprotokolle zum Synchronisieren vom elektrophysiologischen Verstärker (TEC-05X, NPI) mit dem Laser (Rainbow OPO, OPOTEK). **A**, die frequenzmodulierten Pumpstrahlen aus dem Nd:YAG Laser werden über einen optisch parametrischen Oszillator (*OPO*) in ein kontinuierlich einstellbares Farbspektrum transformiert. Über zwei Umlenkspiegel (*US1/2*) wird der Laserstrahl über ein Objektiv (*OJ*, 0.25/3 Spindler und Hoyer) fokussiert und in den Lichtleiter (*LL*, 800/880T, CeramOptec) eingekoppelt. Der Ausgang des LL wurde dann $\leq 5\text{ mm}$ an die Oozyten herangebracht. **B** Um Laserpulse auszulösen, wurde ein softwaregesteuertes Triggersignal zur Steuereinheit des Laser gesendet.

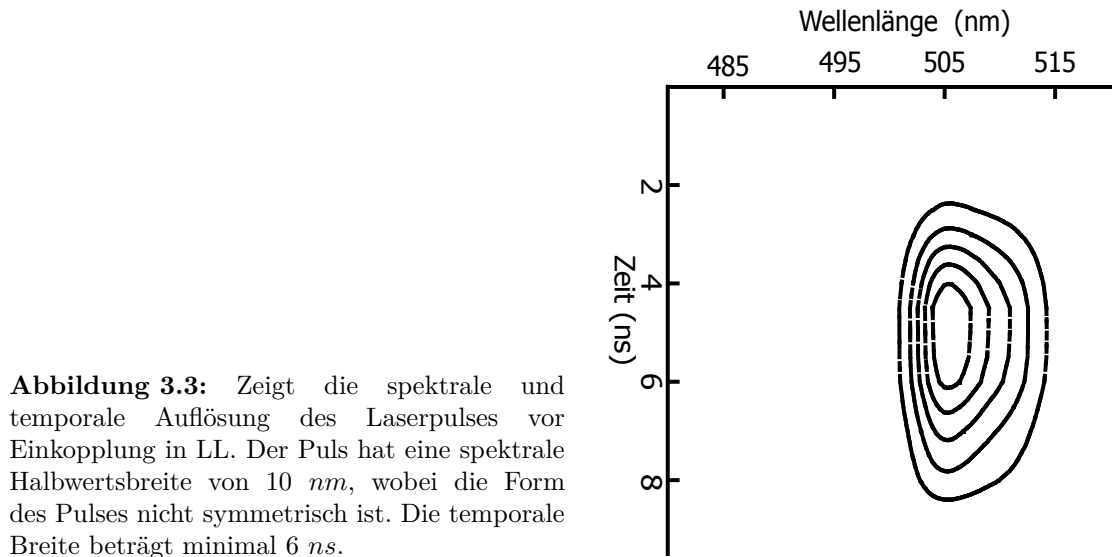


Abbildung 3.3: Zeigt die spektrale und temporale Auflösung des Laserpulses vor Einkopplung in LL. Der Puls hat eine spektrale Halbwertsbreite von 10 nm , wobei die Form des Pulses nicht symmetrisch ist. Die temporale Breite beträgt minimal 6 ns .

3.3.3 Patch-Clamp Messungen an HEK Zellen

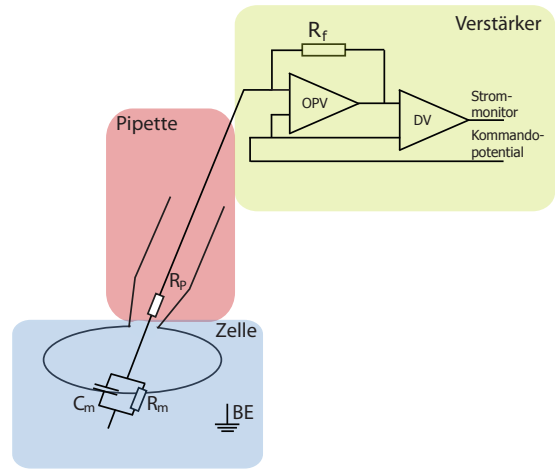
Aufbau der Patch-Clamp Apparatur

Mittels Patch-Clamp Messungen können Ströme $\leq 1 \text{ pA}$ gemessen werden. Im Vergleich zu den Oozytenmessungen werden hier besondere Anforderungen an die Messapparatur hinsichtlich Abschirmung, Dämpfung, Stabilität, Vergrößerung und Elektrodenpositionierung gestellt. Die Elektronik in den Verstärkern besteht aus rauscharmen Bauteilen. Für die durchgeführten Experimente in dieser Arbeit war es nötig, 3 verschiedene Patch-Clamp Apparaturen aufzubauen:

- Axopatch200B Verstärker mit Peltier-gekühltem Vorverstärker(CV2038, Agilent) am Axiovert Mikroskop (Axiovert 35, Carl Zeiss) mit Shutter gesteuerte 75 W Xenonlampe (siehe Abbildung 3.7) [7])
- EPC 7 (HEKA) am IX70 Mikroskop (Olympus) mit einer shuttergesteuerten 75 W Xenonlampe und einer Polychrome V Einheit (siehe Abbildung 3.7); Zum Visualisieren der Fluoreszenz wurde eine luftgekühlte Imago CCD Kamera (Till Photonics) benutzt
- ELC-03XS Verstärker (NPI) am Axiovert Mikroskop (Axiovert 200 TV, Carl Zeiss) mit Polychrome II Einheit (Till Photonics) und LED (Luxeon K2, Lumileds, siehe Abbildung 3.7 C)

Bei einem Patch-Clamp Verstärker wird mit nur einer Elektrode Membranpotential gemessen und Strom appliziert. Im Vergleich zur Zwei-Elektroden-Spannungsklemme können hier nur relativ kleine Ströme fließen. Im spannungsgeklemmten Modus (VC) fließt solange Strom in die Zelle, bis die Membrankapazität (C_m) vollständig umgeladen ist und der Strom komplett über den Membranwiderstand (R_m) zu fließen beginnt. Der zu R_m in Reihe geschaltete Pipettenwiderstand (R_s) wirkt als Spannungsteiler und nur wenn $R_m \gg R_s$ ist, fällt die gesamte Spannung über die Membran ab. Der Strom fließt solange bis der Potentialunterschied zwischen Kommando- und Membranpotential ausgeglichen ist. Die Potentiale werden über einen

Abbildung 3.4: Vereinfachter, schematischer Aufbau einer Patch-Clamp Messkonfiguration. Über den Pipettenwiderstand (R_p) fließt Strom über die Zelle zur Badelektrode (BE). Die Zellmembran wird als Parallelschaltung von Membrankapazität (C_m) und Membranwiderstand (R_m) beschrieben. Wenn $R_m \gg R_s$ fällt die gesamte Spannung über R_m ab und das Membranpotential wird auf den Wert des Kommandopotential geklemmt. Durch den Operationsverstärker (OPV) fließt nur solange Strom über den Rückkopplungswiderstand (R_f) bis keine Potentialunterschiede mehr an den Eingängen des OPVs anliegen. Die dafür notwendige Ladung wird über einen Differenzverstärker (DV) aus dem Vergleich des Ausgangspotentials des OPVs mit dem Kommandopotential bei bekanntem R_f berechnet.



Operationsverstärker (OPV) vergrößert. Mittels eines Differenzverstärkers (DV) und bei bekanntem Rückkopplungswiderstand (R_f) kann die Ladungsmenge, die geflossen ist, bestimmt werden.

Durch Kompensation von Pipetten- und Zellmembrankapazität erhöht sich die Geschwindigkeit mit der das Membranpotential auf das Kommandopotential geklemmt werden kann. Weiterhin konnten die analogen Signale mit einen 5 – 10 kHz Tiefpassfilter am Verstärker vorprozessiert werden. Neben den gerätetechnischen Unterschieden ist der Aufbau der Anlagen prinzipiell ähnlich und soll im Folgenden kurz beschrieben werden:

Mikroskope und Optik Zur Betrachtung der HEK Zellen wurde ein inverses Epifluoreszenz-Mikroskop verwendet das mit einem 10 x, 20 x und 40 x Objektiven ausgestattet wurde. Die Patch-Clamp Messungen erfolgten in der Regel mit einem 40 x Objektiv. Um die Intensität des UV-Anteils bei den Farbstoffmessungen am Olympus Mikroskop zu erhöhen, wurde ein spezielles Objektiv mit hoher UV-Transmission (UAP40XOL/340/1.35 UIS-OBJ, Olympus) verwendet. Es wurde ein UV-transparentes und nichtfluoreszierendes Immersionsöl (10976, SigmaAldrich) genutzt.

Eine zweite, separate Belichtungsquelle erwies sich bei ChR Messungen als besonders

vorteilhaft, da die entsprechenden Wellenlängen und Intensitäten voneinander unabhängig kontrolliert werden konnten. In Abbildung 3.5 ist der schematische Aufbau des optischen Systems für die Patch-Clamp Apparatur gezeigt. Mittels verschiedener Dual- und Tribandfiltersysteme (FT) konnte die Fluoreszenz von ChR exprimierenden HEK Zellen und ionensensitiven Farbstoffen sichtbar gemacht werden. Ein Strahlenteiler (ST2) spiegelte wellenlängenunabhängig Licht zum Anregen der ChRs in das Objektiv und erlaubte gleichzeitig die Darstellung des Transmissionsbildes des Durchlichtstrahlenganges. Durch den ST3 im ∞ -Strahlenraum des Mikroskopes konnte das Zwischenbild des Objektivs teilweise auf die am Seitenausgang befindliche analoge Kamera (KM2) und in das Okular gespiegelt werden. Die am Bildschirm visualisierte Pipette konnte dann mittels des Manipulators feinjustiert werden, ohne dass ein unmittelbarer Kontakt zum Mikroskop nötig war, der möglicherweise störende Erschütterungen hervorgerufen hätte.

Folgende Filter fanden Verwendung:

- ETDualband Farbteiler (FT) 485/565 (AHF Analysetechnik)
- ETDualband Strahlenteiler (ST) 515/650 (AHF Analysetechnik)
- HCTriband FT 444/520/590 (AHF Analysetechnik)
- HCTriband Bandpass (BP) 465/537/623 (AHF Analysetechnik)
- ST 30:70,50:50,70:30 Transmission:Reflexion (Linos)
- BPs Filter (Chroma) Halbwertsbreite $\sim 15 \text{ nm}$
- Neutralfilter (NF) 0.05 – 70 % (Linos)
- Wärmeschutzfilter (Calflex B1/K1, Linos)

Abschirmung und Erdung Das Mikroskop wurde auf einem schwingungsgedämpften Tisch mit 25 mm Lochrasterung (Newport) positioniert. An der Rasterung konnten optische Elemente, Mikromanipulator und Mikroskop gegeneinander ausgerichtet und

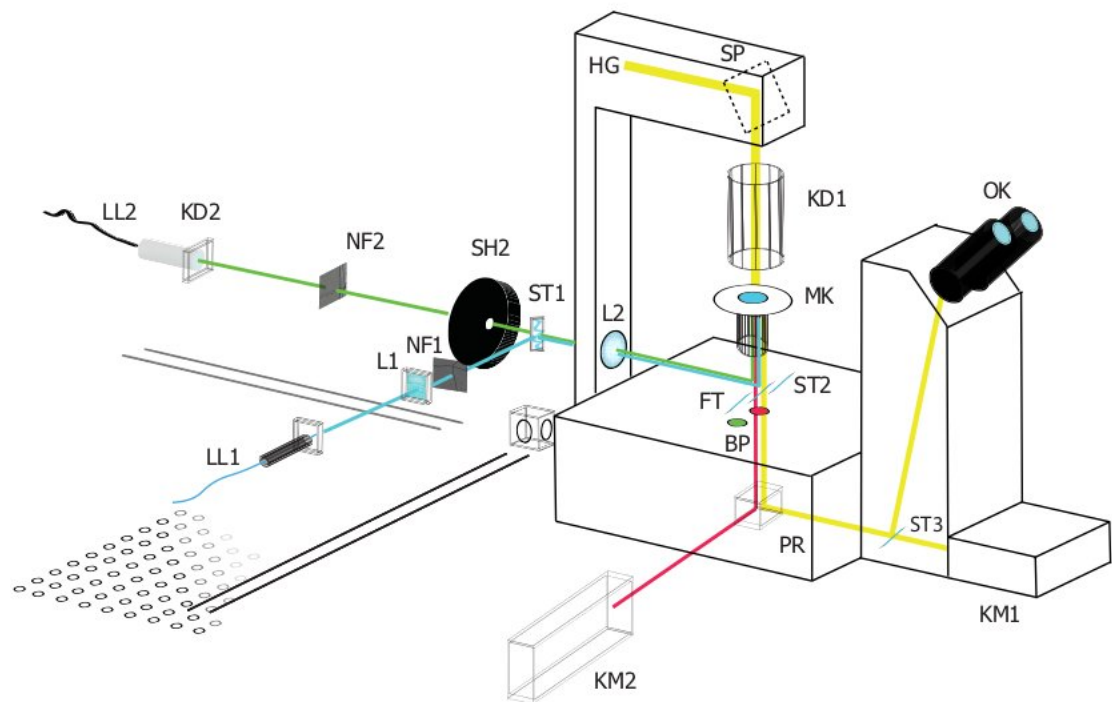


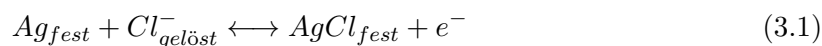
Abbildung 3.5: Schematischer Aufbau des Mikroskop- und Anregungsstrahlenganges zum Visualisieren, Anregen und elektrophysiologischem Vermessen von ChR exprimierenden Zellen. Es werden 2 unabhängige Lichtquellen verwendet ($LL1$ und $LL2$). $LL1$ wird über die Linse ($L1$ $f=22.5\text{ mm}$) in den Anregungsstrahlengang eingekoppelt. Am Austritt von $LL2$ ist direkt ein Epifluoreszenzkondensor ($KD2$, Till Photonics) zum Parallelisieren des Lichtes angebracht. Beide Strahlengänge können durch Neutralfilter ($NF1$ und $NF2$) je nach Anwendung abgeschwächt werden. Durch den Shutter (SH) kann störendes Hintergrundlicht vom Polychrome vermieden werden (siehe Abbildung 3.7). Beide Strahlengänge werden mittels Strahlenteiler ($ST1$) vereinigt und über die Einkopplungslinse ($L2$, $f=55\text{ mm}$). Die Fluoreszenz der Zellen kann mit dem jeweiligen Farbteiler (FT) und Bandpassfilter (BP) visualisiert werden. Um während der elektrophysiologischen Messung wellenlängenunabhängig Licht ins Objektiv zu reflektieren, wird $ST2$ in den Strahlengang eingeschoben. Als Durchlichtstrahlenquelle dient eine Halogenlampe (HG 12 V , 25 W), deren Licht über einen Spiegel (SP) in den Kondensor ($KD1$) reflektiert wird. Um die maximale Fluoreszenzintensität zu detektieren, wird das Prisma (PR) so positioniert, dass die gesamte Emission auf die CCD Imago Kamera ($KM2$, Till Photonics) reflektiert wird. Durch entsprechende Repositionierung vom PR kann auch 100 % des Transmissions- oder Emissionslichtes zum Okular gelenkt werden. Hier kann durch $ST3$ auch ein Teil des Lichtes zur analogen Kamera ($KM1$) reflektiert werden.

befestigt werden.

Um zusätzlich neben der elektrischen Abschirmung störendes Raumlicht zu vermeiden, wurde der Faradaysche Käfig mit einer elektrostatischen, schwarzen Folie überzogen (Luftpolsterfolie, Carbostat PK Elektronik).

Zum Erden diente ein zentraler Kupferblock am schwingungsgedämpften Tisch, an dem alle Potentialquellen sternförmig mit isoliertem Kupferkabel miteinander verbunden wurden.

Elektroden Durch die geringe Löslichkeit von Silber in wässriger Lösung ist das elektrochemische Potential einer solchen Elektrode sehr instabil. Durch elektrolytisches Abscheiden von AgCl auf der Oberfläche der Silberelektrode konnte das Elektrodenpotential an die ausreichend hohe Cl^- Konzentration geknüpft werden:



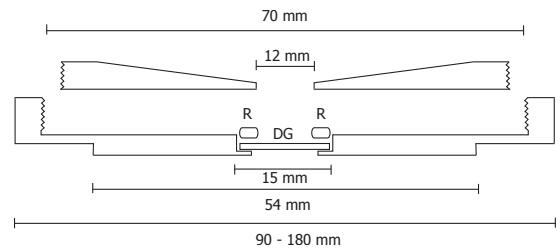
Mittels elektrochemischer Oxidation in einer 3 M KCl-Lösung bei ~ 0.7 A konnte an die mit Schleifpapier angerauhten und gesäuberten Silberdrähte AgCl abgeschieden werden. Als Elektrode fungierten:

- Badelektrode 0.64 mm Silberdraht (AG-25T, Science Products)
- Pipettenelektrode 0.25 mm Silberdraht (AG-10T, Science Products)
- Platindrahtkathode ~ 0.2 mm für Elektrolyse

Beim Austausch der extrazellulären Lösung verändert sich das Elektrodenpotential der BE. Deshalb wurden über die chlorierten Silberelektrode ein 1 %er Agarschlauch mit 100 mM NaCl gestülpt. Der Widerstand der BE betrug ~ 550 k Ω . Die Diffusion von NaCl aus dem Agarschlauch liegt nach Abschätzung bei ≤ 1 μ M pro 30 min [122].

Pipetten Die Pipetten wurden aus Mikrohämotokrit Glaskapillaren (Hecht-Assistent, Sondheim) gezogen. Die Kapillaren wurden vorher in Azeton gereinigt und über einer offenen Flamme getrocknet.

Abbildung 3.6: Querschnitt einer typischen Messkammer. Sie besteht aus zwei Teilen. In dem unteren Teil wird das Deckglas (*DG*) mit Silikon an die Kammer gelegt. Der Gummiring (*R*) hat einen Außendurchmesser von 15 mm und einen Innendurchmesser von 13 mm. Er wird durch das Einschrauben des Innenkreisels gegen das *DG* gedrückt und dichtet damit die Kammer ab.



Mit dem Pipetten-Ziehgerät (P97, Sutter Instrument) mit einem Kasten-Fillament wurden die Patch-Pipetten hergestellt. Die Spitzen der Patch-Pipetten wurden mit einem glühenden Platindraht unter einer 20 facher Vergrößerung glatt und stumpf poliert (Televal ID03).

Druckapplikation Während einer Patch-Clamp Messung musste sowohl Über- als auch Unterdruck aufgebaut werden. Der Überdruck verhinderte ein Anlagern von Verunreinigungen an der Pipettenspitze während des Positionierens. Unterdruck unterstützt die Ausbildung eines hohen Abdichtungswiderstandes zwischen Pipette und Zellmembran.

Der Druck konnte über eine $\sim 1\text{ m}$ lange Wassersäule reguliert werden. Über einen 3-Wege-Hahn (P340, Carl Roth) konnte reguliert werden, ob der Druck schnell durch Saugen beziehungsweise Pusten oder konstant über die Wassersäule appliziert wird [7].

Messkammer Der Techniker A. Laws stellte die Messkammer nach Anleitung aus Teflon oder Plexiglas her (siehe Abbildung 3.6). Die mit Zellen bewachsenen 15 mm runden Deckgläser wurden in die Vertiefung mit Silikon (0857, GE Bayer Silicons) angedrückt. Durch Einschrauben des Innenkreisels drückt ein Gummiring das Deckglas weiter an und dichtet es ab. Die Kammern konnten mit $\sim 100 - 1500\text{ }\mu\text{l}$ Puffer gefüllt werden.

Perfusion Die Perfusion umfasst eine Absaug- und Zuflussvorrichtung. Um den Unterdruck zum Absaugen aufzubauen, wurde entweder eine Peristaltikpumpe (PumpPro MPL, 4 Channels) oder eine Vakuum-Membranpumpe (K517, Carl Roth)

benutzt. Ein gebogenes Metallröhrchen mit einem 1 *mm* großen Durchmesser und seitlicher Öffnung wurde an die Messkammer positioniert und saugte extrazelluläre Lösung ab, wobei trotz kontinuierlichem Zufluss der Flüssigkeitskonus in der Messkammer konstant blieb. Zwischen der Pumpe und der Absaugvorrichtung wurde eine Flüssigkeitsfalle eingebaut.

Die extrazelluläre Lösung konnte entweder durch Zugabe von Puffer mittels Pipette oder kontinuierlich über ein Pufferreservoir (12 *ml*) gewechselt werden. Die Flussgeschwindigkeit konnte je nach Höhenunterschied zwischen Pufferreservoir und Messkammer eingestellt werden. Sie betrug bei ~ 30 *cm* Höhenunterschied in der Regel $1 - 2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Die einzelnen Pufferreservoirs konnten über magnetische Ventile (ALA Science) mit der Messkammer verbunden werden. Über eine selbstgebaute TTL Ansteuerung von Robert Arndt konnten die Ventile kontrolliert werden. Um das Totvolumen zu minimieren, wurden Teflonschläuche mit 0.5 *mm* Ø (Carl Roth) verwendet.

Mikromanipulatoren Die Mikromanipulatoren wurden an der Rasterung des Tisches befestigt und waren ansonsten vom Mikroskop entkoppelt:

- Luigs und Neumann (Model: SM 1)
- Scientifica (Model: PatchStar)

Digitalisierung und Software Als Schnittstelle zwischen Computer und den analogen Geräten in der Patch-Clamp Anlage wurde der Digital-Analog-Wandler Digidata1440 (Agilent) genutzt. Die Daten wurden in der Regel mit einem 5 bis 10 *kHz* Tiefpassfilter geglättet. Die Aufnahmefrequenz wurde nach Nyquist entsprechend angepasst [123].

Die Signale konnten mit der pClamp Software (Version 10.2, Agilent) eingelesen, generiert und ausgegeben werden.

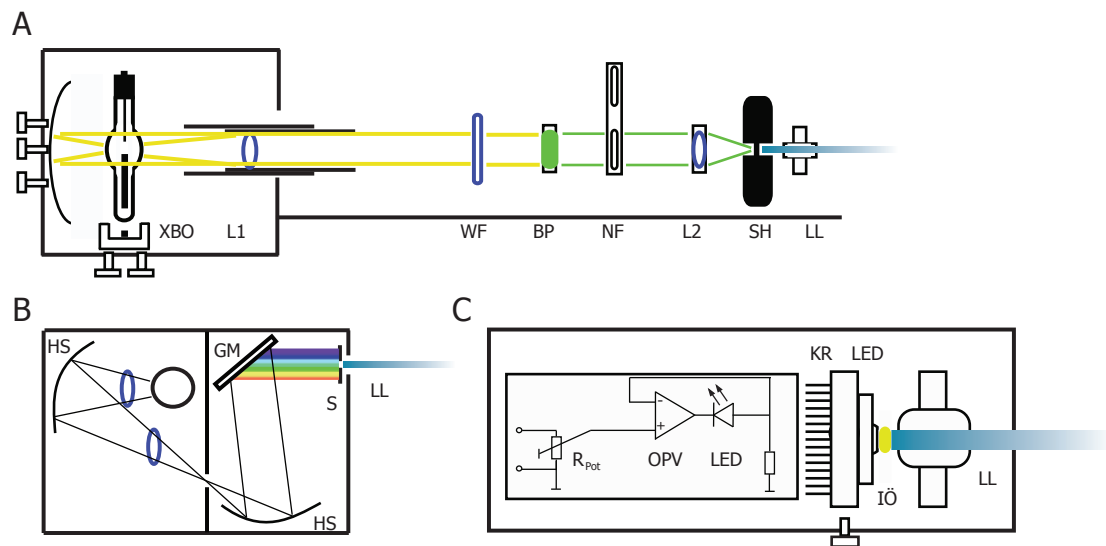


Abbildung 3.7: Zeigt eine schematische Darstellung der verwendeten Belichtungssysteme. In **A** ist der Strahlengang der Xenon-Kurzbogenlampe (75 W, Osram, *XBO*) gezeigt. Durch den eingebauten Hohlspiegel wird mehr Weißlicht auf die gegenüberliegende asphärische Kondensorlinse (*L1*, f 18 mm, Linos) reflektiert. Der Wärmeschutzfilter (*WF*) transmittiert nur Licht ≤ 700 nm. Mittels des Bandpassfilters (*BP*) wird ein Wellenlängenbereich selektiert. Mittels eines Filterrades mit verschiedenen Neutralfiltern (*NF*) kann die Lichtintensität eingestellt werden. Eine achromatische Linse (*L2*, $f=27$ mm, Linos) fokussiert das Anregungslicht durch den Shutter (*SH*, 6 mm, LS6T, Uniblitz) auf den Lichtleiter (*LL*, 1700/1800T, CeramOptec). In **B** ist der Strahlengang für den Polychrome gezeigt. Über zwei Hohlspiegel (*HS*) wird das Weißlicht der Xenonlampe auf ein Blazegitter gelenkt. Je nach Ausrichtung des Gitters fällt ein bestimmter Farbbereich des Spektrums durch den Spalt (*S*) auf den LL (Till Photonics). **C** Die Intensität der LED (K2, 5 W, Luxeon) kann mit der selbstgebaute LED Ansteuerung über ein analoges Signal geregelt werden. Die Kühlrippen dienen der verbesserten Wärmeabfuhr, da durch das kurzzeitige Pulsen mit bis zu 1000 mA eine erhöhte Wärmeentwicklung auftritt (*KR*). Durch Immersionsöl (*IÖ*) können LED und LL effizienter miteinander gekoppelt werden.

Lichtquellen

Xenonlampe Die Xenon-Kurzbogenlampe (75 W, Osram) wurde mit einer geglätteten Gleichstromquelle (LSN151, LOT) betrieben. An das eigentliche Lampengehäuse (lh-x75i, Leistungselektronik Jena) installierte der Techniker, Herr Schmidt, die optische Bank, um daran die einzelnen Komponenten zu befestigen (siehe Abbildung 3.7).

Der Shutter (LS6T, Uniblitz) konnte über eine Steuereinheit (VMM-T1, Uniblitz) entweder manuell oder mit TTL Pulsen von der pClamp-Software gesteuert werden.

Die Geschwindigkeit des Shutters zum vollständigen Öffnen betrug je nach Größe der Iris zwischen 300 und 1500 μs (siehe Abbildung 3.8 B).

Polychrome Die Polychrome II und V wurden mit einer 75 beziehungsweise 150 W Xenon-Kurzbogenlampe (XBO) betrieben. Das Kernstück des Belichtungssystems ist das auf einem Galvanometer befestigte Blazegitter. Das Licht wird durch das Gitter spektral aufgespreizt und ein entsprechender Farbbereich strahlt durch einen Spalt auf den LL (siehe Abbildung 3.7 B). Je nach Öffnung des Spaltes kann die spektrale Halbwertsbreite des ausgekoppelten Lichtes auf 15 – 3 nm eingestellt werden. Da die Polychromesysteme keinen eingebauten Shutter besitzen, wird das Blazegitter zwischen zwei Belichtungen auf eine Position ausgelenkt, in der nur Lichtanteile höherer Ordnung auf den LL fallen. Diese sogenannte Ruheposition wurde auf 720 nm gestellt und besaß dann weiterhin eine Lichtleistung von $28 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ in Objektebene. Hierbei beträgt der Anteil des Lichtes mit einer Wellenlänge von $450 \text{ nm} \leq 3 \text{ } \mu\text{W} \cdot \text{cm}^{-2}$ und bei $560 \text{ nm} \leq 5 \text{ } \mu\text{W} \cdot \text{cm}^{-2}$. Diese Angaben beziehen sich auf 100 % Lichtintensität am Polychrome bei maximaler Spaltöffnung.

Das Blazegitter kann sich mit einer Geschwindigkeit von $\sim 120 \text{ nm} \cdot \text{ms}^{-1}$ auf eine entsprechende Wellenlänge einstellen (siehe Abbildung 3.8 A). Während des Umschwenkens des Blazegitters fallen alle Wellenlängen, die zwischen Start- und Endposition liegen auf den Lichtleiter. Da dieser Effekt bei einigen Messungen störend war, wurde nachträglich am Mikroskop ein Shutter (VS25, Uniblitz) montiert (siehe Abbildung 3.5 SH2). Dieser Shutter öffnete sich erst, wenn sich der Polychrome auf die gewünschte Wellenlänge eingestellt hatte und schloss sich wieder vor dem Umschwenken des Blazegitters.

LED Die lichtemittierenden Dioden der Firma Luxeon besitzen laut Herstellerangaben eine Strahlungsleistung von 2 (LXHL-FL3C, 590 nm) – 70 mW (LXHL-LR5C, 455 nm) und eine spektrale Halbwertsbreite von 20 – 35 nm [124]. Durch die selbstgebaute Ansteuerung von Robert Arndt konnte der Strom über die LEDs mit einer Steuerspannung von bis zu 20 V über die Software geregelt werden (siehe Abbildung 3.7).

Bei einer Steuerspannung von 15 V besitzt der Lichtstrom eine Anstiegskinetik von $\leq 100 \mu s$. Dabei fließt ein Strom über die LED von 1000 mA. Die LED wurde auf eine Kühlrippe mit Wärmeleitpaste montiert, um so ein Überhitzen zu vermeiden. Die Kühlrippe mit der befestigten LED konnte über eine X-Y Positionierungsplatte gegenüber dem LL feinjustiert werden. Die über dem Halbleiterelement fixierte Plastiklinse (Lambertian Strahlungsprofil) wurde mit Polierpapier gerade geschliffen, um eine bessere Einkopplung in den Lichtleiter zu ermöglichen. Durch Verwendung von Immersionsöl (NA 1.3) konnte das Licht um 5 % effizienter in den Lichtleiter eingekoppelt werden.

Lichtmessung Zur Bestimmung der Lichtleistung der jeweiligen Belichtungsquellen diente ein Optometer (Messkopf PD-93 und Steuereinheit P9710, Gigahertzoptik). Ein radiometrischer Korrekturfilter (PD-9304RW, Gigahertz-Optik)glich die Wellenlängenabhängigkeit der Silizium-Photodiode aus. Die Größe des Belichtungsfleckes in der Objektebene wurde mit einem Objektmikrometer (5 + 100/100y d=0,16mm, Carl Zeiss) bestimmt und besaß einen Durchmesser von 150 – 300 μm .

Protokolle

Bestimmung der Membrankapazität Die Membrankapazität wurde nach einer Methode von Schmitt *et al.* [125] bestimmt. Mit einer Spannungsrampe wurde die Membran mit einer Geschwindigkeit von $0.5 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ von 0 auf -50 mV aufgeladen und mit gleicher Geschwindigkeit wieder auf 0 mV entladen. Die dabei geflossene Gesamtladung (Q) setzt sich aus dem über Widerstand und Kapazität geflossenem Ladungsanteil zusammen:

$$Q = Q_{Rm} + Q_{Cm} \quad (3.2)$$

Lichtquelle	Leistung ($mW \cdot cm^{-2}$)	Besonderheit
Xenon	171	BP 450 – 490 nm
	80	BP 450 FWHM 30 nm + ST1 (30 % R)
	17	BP 560 FWHM 30 nm + ST1 (30 % R)
Polychrome II	/	
Polychrome V	30	380 nm FWHM 15 nm + ST1 (70 % T)
	5	380 nm FWHM 7 nm + ST1 (70 % T)
	117	470 nm FWHM 15 nm + ST1 (70 % T)
	23	470 nm FWHM 7 nm + ST1 (70 % T)
	63	560 nm FWHM 15 nm + ST1 (70 % T)
	12	560 nm FWHM 7 nm + ST1 (70 % T)
LED	12	455 nm LXHL-LR5C + ST1 (30 % R)
	2	505 nm LXHL-LE5C + ST1 (30 % R)
	1	590 nm LXHL-FL3C + ST1 (30 % R)

Tabelle 3.6: Tabellarische Auflistung der Lichtintensitäten für die jeweils verwendeten Lichtquellen. Die Angaben des Strahlenteilers (ST , siehe Abbildung 3.5) beziehen sich zum einen auf den Anteil des Lichtes, der zur Probe reflektiert wurde (R , Lichtleiter LL1 in Abbildung 3.5) oder zum anderen auf die Transmission (T , Lichtleiter LL2 in Abbildung 3.5). Die angegebenen Werte beziehen auf die tatsächliche Lichtleistung in der Objektebene.

Da die Spannungsänderung der beiden Rampen entgegengesetzte Vorzeichen haben,

$$\Delta U_{\text{aufladend}} = -\Delta U_{\text{entladend}} \quad (3.3)$$

ergibt sich für die Differenz der Gesamtladung von Auf- beziehungsweise Entladung folgender Sachverhalt:

$$\Delta Q = (Q_{Rm(auf)} + Q_{Cm(auf)}) - (Q_{Rm(ent)} - Q_{Cm(ent)}) \quad (3.4)$$

und damit ergibt sich:

$$\Delta Q = 2 \cdot Q_{Cm} \quad (3.5)$$

Die Rampen zum Bestimmen der Membrankapazität waren jedem Messprotokoll aus

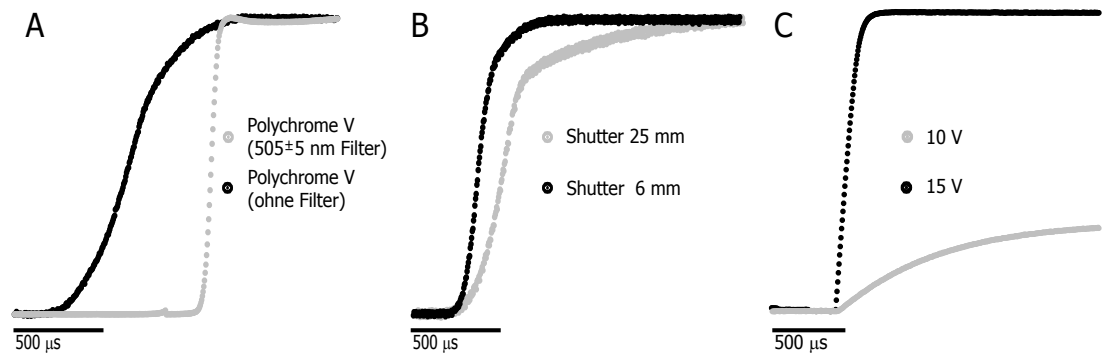


Abbildung 3.8: Reaktionszeiten von Shutter-, Polychrome- und LED Belichtungssystemen. Die gezeigten Daten wurden mit einer UV-Photodiode (BPX 61, Osram) bei 250 kHz Aufnahmefrequenz aufgenommen. Die *schwarze Kurve* in **A** beschreibt die vom Polychrome benötigte Zeit, um sich von der Ruheposition 720 nm auf 505 nm einzustellen. Um die tatsächliche Zeitdauer bis das Blazegitter auf 505 nm ausgerichtet war, zu bestimmen, wurde ein 505±5 nm Bandpassfilter vor die Photodiode installiert (*graue Kurve*). In **B** sind die verschiedenen Öffnungszeiten zweier Shutter mit einem Irisdurchmesser von 6 beziehungsweise 25 mm gezeigt. Um vollständig zu öffnen, benötigt der 6 mm Shutter $\sim 300 \mu s$ und der 25 mm $\sim 1500 \mu s$. **C** zeigt die Geschwindigkeit, mit der die LED (LXHL-LR5C $\sim 455 \text{ nm}$, Luxeon), abhängig von der angelegten Spannung, auf eine stabile Lichtintensität gebracht werden kann.

Abbildung 3.10 vorangestellt. Die Stromdichte (J) berechnet sich aus dem Quotienten des Photostroms und der Kapazität.

$$J = \frac{I_{\text{Photostrom}}}{(Q_{Cm}/\Delta U)} \quad (3.6)$$

Messung des Aktionsspektrums Die Aktionsspektren wurden am Polychrome-System bei - 60 mV aufgenommen. Die Wellenlänge änderte sich in 5 nm Schritten von 350 auf 650 nm. Die Halbwertsbreite der jeweiligen Wellenlänge betrug 7 nm bei 50 % der maximalen Lichtleistung. Die Pulsdauer betrug 10 ms. Zwischen den einzelnen Wellenlängen gab es eine Pause von 2 s.

Messung der Erholungskinetik Die Membranspannung wurde entweder lediglich für 500 ms vor und nach dem jeweiligen Lichtpuls auf - 60 mV ($\tau_{\text{Erk},0mV}$) geklemmt oder für die gesamte Dauer der Messung auf dieser Membranspannung gehalten ($\tau_{\text{Erk},-60mV}$).

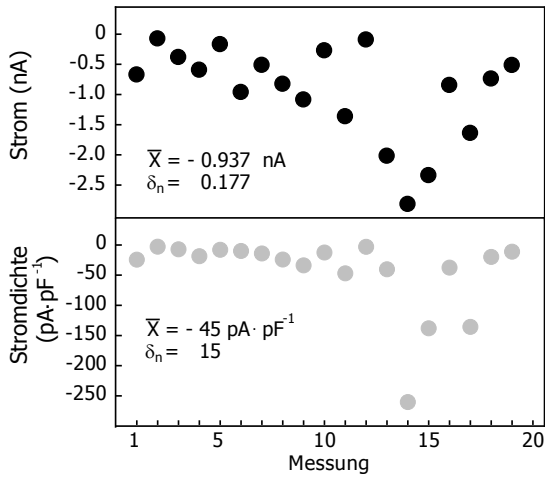


Abbildung 3.9: Zeigt die Streuung der einzelnen transienten Photostromamplituden von C2 bei pH 7.2 mit 140 mM NaCl. In der oberen Abbildung (*schwarze Symbole*) sind Photostromamplituden von 19 verschiedenen Zellen dargestellt. Die unteren *graue Symbole* sind mit Hilfe der nach Gleichung 3.5 berechneten Membrankapazität korrigierten Photostromamplituden (Stromdichte). Obwohl sich der δ_n nicht deutlich verbessert, streuen die korrigierten Photostromamplituden, mit Ausnahme einiger Ausreißer, näher um \bar{x} . Die Photostromamplituden wurden bei lightsättigenden Intensitäten $\geq 68 \text{ mW} \cdot \text{cm}^2$ aufgenommen. (beide Diagramme sind gleich gespreizt)

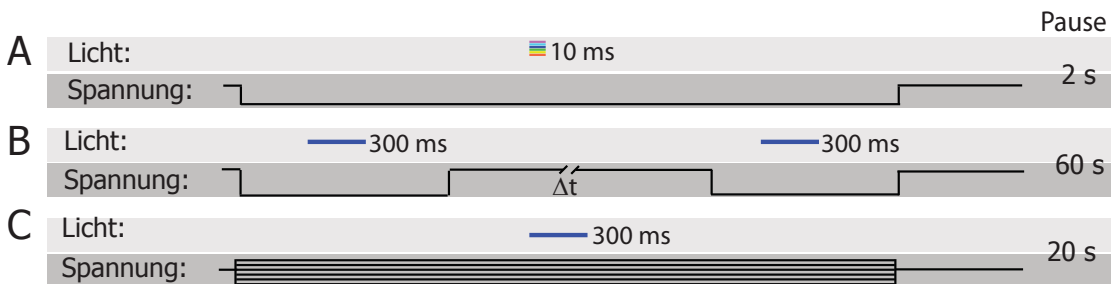


Abbildung 3.10: Illustriert die verwendeten Patch-Clamp Messprotokolle bezüglich Belichtung und Membranspannung. Zum Messen der Abhängigkeit des Photostroms von der Wellenlänge fand das in **A** dargestellte Protokoll Anwendung. Hierbei betrug die Membranspannung -60 mV und der Lichtpuls 10 ms . Das Licht wurde dabei in 5 nm Schritten von 350 auf 650 nm erhöht. Zwischen den jeweiligen Einzelmessungen wurde 2 s gewartet. Das in **B** gezeigte Protokoll für das sogenannte Doppelpulsexperiment diente zum Bestimmen des τ_{Erk} . Hierfür wurde die Dauer (Δt) zwischen zwei Lichtpulsen variiert. Das Umkehrpotential konnte durch stufenweises Erhöhen der Membranspannung um jeweils 20 mV von -60 mV bis 40 mV bestimmt werden **C**.

nicht gezeigt in Abbildung 3.10 B). Zwischen zwei einzelnen Messungen wurde 60 s gewartet. Die Messung fand unter lichtsättigenden Bedingungen statt.

Messung des Umkehrpotentials Die Umkehrpotentiale wurden entweder an transient transfizierten HEK293 - oder an der stabilen HEK-ChR2-YFP Zelllinie gemessen (siehe Abschnitt 3.2.4). Nach dem Aufbrechen des Membranpatches und dem Übergehen zur Ganzzelleableitung wurde 30 s gewartet, um sicherzustellen, dass sich das gesamte Zytoplasma gegen die Pipettenlösung ausgetauscht hat [126, 127]. Zwischen den einzelnen Spannungsschritten wurde je 20 s gewartet.

3.4 Fluoreszenzmessungen

3.4.1 Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung

Apparatur zur zeitaufgelösten Fluoreszenzmessung

Die zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen wurden an der in Abbildung 3.5 gezeigten Anlage durchgeführt. Die Farbstoffanregung erfolgte in der Regel mit dem Polychrome-System über LL2. Dagegen erfolgte die Aktivierung der ChRs entweder mit der LED oder mit der Xenon-Lampe über LL1. Beide Strahlengänge wurden am Epilfluoreszenzeingang mit einem 50:50 ST1 vereinigt. Um eine Ko-Aktivierung der ChR beim Belichten der Farbstoffe zu verhindern, wurde der Strahlengang mit NF2 je nach Messung abgeschwächt (5 – 25 %, $1.5 - 7.5 \text{ mW} \cdot \text{cm}^2$ bei 380 nm bzw. $2.5 - 12.5 \text{ mW} \cdot \text{cm}^2$ bei 440 nm). Zur Messung wurde die gesamte Fluoreszenz auf die CCD Kamera (KM2) (Imago, Till Photonics) mit dem PR umgelenkt (siehe Abbildung 3.5).

Protokolle

Die zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen dienten zum einen dazu, die Aktivität eines spannungsabhängigen Kalziumkanals ($Ca_v3.2$) optisch zu modulieren, und zum anderen den Kalziumeinstrom über verschiedene genetische und chemische Farbstoffe zu detektieren. Die hierfür verwendete mTrek Zelllinie exprimierte stabil neben

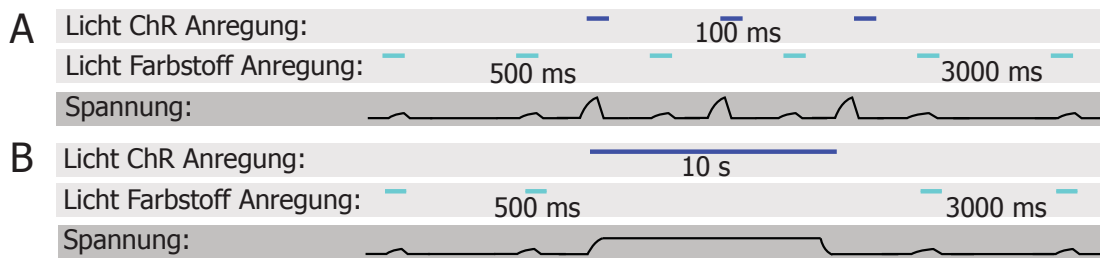


Abbildung 3.11: Zeigt den prinzipiellen Ablauf zweier Typen von Messprotokollen für die zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung. Die *hellgrau* unterlegten Blöcke geben schematisch den zeitlichen Ablauf der Belichtungspulse für ChR- und Farbstoffanregung wieder. In den *dunkelgrauen* Blöcken ist der vermeintliche Verlauf der Membranspannung schematisch dargestellt. **A** zeigt das Messprotokoll, in dem zwischen den Farbstoffanregungen (Belichtungszeit: 500 ms, Aufnahme Frequenz: 0.33 Hz) die ChRs mit einem 100 ms intensiven Lichtpuls aktiviert werden. **B** zeigt ein ähnliches Messprotokoll wie in A, mit dem Unterschied, dass hier einmalig ChRs für 10 s angeregt werden.

dem Kalziumkanal $Ca_V3.2$ auch einen Kaliumkanal $mTrek$ [120]. Diese Art von Experimenten konnte anhand des Protokolls aus Abbildung 3.11 **A** durchgeführt werden. Mittels zeitaufgelöster Fluoreszenzmessung konnte auch die Kalziumleitfähigkeit der ChRs untersucht werden. Hierfür wurden die ChR-Konstrukte transient in die HEK293 Zelllinie transfiziert, mit Fura-2 beladen und anschließend gemäß dem Protokoll aus Abbildung 3.11 **B** vermessen.

Die Zellen wurden mit einem 40 x Objektiv vergrößert und die Fluoreszenz bei einer Belichtungszeit von 500 ms integriert und mittels einer CCD Kamera mit einer Auflösung von 480 x 640 detektiert. Aufnahmen erfolgten alle 3 s. Die ChRs konnten entweder manuell oder softwaremoduliert mit einem intensiven Lichtpuls über den Strahlengang 2 angeregt werden. Das Signal-Rausch-Verhältnis der Farbstofffluoreszenz konnte bei gegebener Lichtintensität durch das Zusammenfassen benachbarter Pixel verbessert werden (2x2 und 4x4 Binning).

3.4.2 Konfokale Mikroskopie

Konfokale Bilder wurden an einem invertierten, konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (IX81, Olympus) aufgenommen. Die Zellen wurden mit einem 60

x Wasserimmersionsobjektiv (60 x / 1.2 Water UPlanSApo) vergrößert. Die Fluoreszenzanregung erfolgte mit einer 440 oder 561 nm Laserdiode. Die Fluoreszenzemission konnte über einen spektralen PMT-Detektor erfasst werden. Die ImageJ Software diente der Analyse der aufgenommenen Bilder. Für die Aufnahme der Fluoreszenzbilder bin ich der AG Hermann und insbesondere Thomas Korte und Christian Sieben zu Dank verpflichtet.

3.5 Datenanalyse und Auswertung

Software Die Daten für die elektrischen Messungen wurden mit dem Clampex Softwarepaket (Version 10.2, Agilent) ausgewertet. Zum Auswerten der zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen konnte auf die Algorithmen der Tillvision Software (TILLvisION 4.5.57, Till Photonics) zurückgegriffen werden.

Zur statistischen Analyse und Aufbereitung der Daten fanden folgende Softwarepakete zusätzliche Anwendung:

Adobe Illustrator	(Version 13, Adobe)
Gentle	(Version 1.9.4, GPL)
ImageJ	(Version 1.44, NIH)
MatLab	(Version 7 (R14), MathWorks)
Microsoft Excel	(Version 2003, Microsoft)
Octave	(Version 0.92, GPL)
Origin	(Version 7.0, OriginLab Corporation)
Pymol	(Version 1.2 (R2), DeLano Scientific)
Sigmaplot	(Version 11.0, Systat Software)
Swiss PDB Viewer	(Version 4.0.2, Swiss Institute Bioinformatics)
VMD	(Version 1.87, GPL)

Zur Quantifizierung der Aussagekraft des Mittelwertes wurde der Standardfehler (δ_n) angegeben.

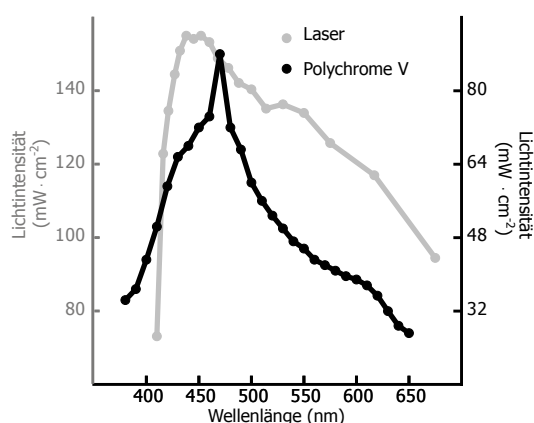


Abbildung 3.12: Zeigt das wellenlängenabhängige Intensitätsspektrum des Polychrome- und des Lasersystems. Die Laserleistung wurde mit einem Joulemeter (Field Max II- TO, Coherent) hinter dem Lichtleiter bestimmt (*grau*). Das Spektrum des Polychrome-Systems wurde mit dem Optometer (siehe 3.3.3) bei 7 nm Halbwertsbreite gemessen (*schwarz*).

Um die Unabhängigkeit des Mittelwertes zweier Stichproben zu untersuchen, diente der Zweistichproben-t-Test nach Student. Das Signifikanzniveau (α) stellt die Obergrenze, mit welcher Wahrscheinlichkeit die Nullhypothese fälschlicherweise abgelehnt wird, dar. In dieser Arbeit symbolisiert $*$ $\equiv \alpha = 5\%$, $**$ $\equiv \alpha = 1\%$ und $***$ $\equiv \alpha = 0.5\%$.

Auswertung der Aktionsspektren Die maximalen Photostromamplituden wurden hinsichtlich der Lichtleistung der jeweiligen Belichtungsquelle für jede Wellenlänge korrigiert und anschließend auf den maximalen Photostrom normalisiert (siehe Abbildung 3.12). Mittels einer Weibull Funktion konnten die meisten Aktionsspektren gut nachvollzogen und der λ_{max} Wert bestimmt werden. Dagegen wurden Spektren mit Schultern durch die Summe zweier Gaußskurven angenähert.

Auswertung Abklingkinetik Die Abklingkinetik wurde monoexponentiell mit folgender Gleichung bestimmt:

$$I(t) = A \cdot e^{-t/\tau_{Abk} \cdot C} \quad (3.7)$$

Auswertung der Doppelpulsexperimente Zum Bestimmen der Regeneration der transienten Photostromamplitude diente folgendes Verhältnis:

$$\phi_{Erk} = \frac{I_{trans,\Delta t} - I_{stat,\Delta t}}{I_{trans,t0} - I_{stat,t0}} \quad (3.8)$$

Um anschließend τ_{Erk} zu ermitteln, wurde die Abhängigkeit von ϕ_{Erk} zu Δt mit folgender monoexponentieller Funktion angenähert:

$$\phi_{Erk} = A(1 + e^{1/\tau_{Erk} \cdot \Delta t}) \quad (3.9)$$

Auswertung der Umkehrpotentiale Strom-Spannungskurven vom transienten sowie stationären Photostrom konnten mit einem $R^2 > 0.98$ mit folgender Gleichung angenähert werden:

$$I(U) = I_o + A \cdot e^{b \cdot U} \quad (3.10)$$

Mit den Parametern aus Gleichung 3.10 konnte das Umkehrpotential für $I(U) = 0$ errechnet werden. Die Umkehrpotentiale wurde automatisch mit einem selbstgeschriebenen MatLab Skript aus den Stromspuren ermittelt.

Die jeweiligen Permeabilitätsverhältnisse der verschiedenen Ionensorten konnten aus dem Umkehrpotential (U_{Ukp}) bei bekannter intra- und extrazellulärer Ionenkonzentration mittels der Goldmann-Gleichung berechnet werden [128]:

$$U_{Ukp} = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_{Na^+}[Na^+]_o + P_{K^+}[K^+]_o + P_{Cl^-}[Cl^-]_i}{P_{Na^+}[Na^+]_i + P_{K^+}[K^+]_i + P_{Cl^-}[Cl^-]_o} \quad (3.11)$$

Die Herleitung der Goldmann-Gleichung beruht auf den Annahmen eines konstanten elektrischen Feldes über der Membran und einer unabhängigen Bewegung der Ionen.

Da sich bei Messungen an untransfizierten Zellen die Membranleitfähigkeit nicht lichtinduziert verändern lässt, kann der gemessene Photostrom in ChR-positiven Zellen

nur auf die spezifische Permeabilität der ChRs zurückgeführt werden.

$$U_{Ukp} = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_{Na^+}(h \cdot \nu)[Na^+]_o + P_{K^+}(h \cdot \nu)[K^+]_o + P_{H^+}(h \cdot \nu)[H^+]_o}{P_{Na^+}(h \cdot \nu)[Na^+]_i + P_{K^+}(h \cdot \nu)[K^+]_i + P_{H^+}(h \cdot \nu)[H^+]_i} \quad (3.12)$$

Da bei der Ganzzellableitung die verwendeten Ionenkonzentrationen frei wählbar sind, vereinfacht sich die Gleichung 3.12 beim Verwenden von nur einem monovalenten Kation (Kat^+) und H^+ wie folgt [129, 130]:

$$U_{Ukp} = \frac{RT}{F} \ln \frac{[Kat^+]_o + b[H^+]_o}{[Kat^+]_i + b[H^+]_i} \quad (3.13)$$

Des Weiteren wurde angenommen, dass ChRs keine Leitfähigkeit für Cl^- besitzen!

b stellt das Permeabilitätenverhältnis der betrachteten Ionensorten dar und drückt aus, wieviel stärker die eine Ionenspezies gegenüber der anderen geleitet wird.

$$b = \frac{P_{H^+}(h \cdot \nu)}{P_{Kat^+}(h \cdot \nu)} \quad (3.14)$$

Der Anteil der geleiteten divalenten Kationen ist bei neutralem oder saurem pH-Wert gering und wurde in diesem Ansatz vernachlässigt [20, 58]. Die unveränderten Konzentrationen von monovalenten und divalenten Kationen können dennoch ein Einfluss auf die Permeabilitätenverhältnis haben. Die in dieser Arbeit angegebenen Permeabilitätsverhältnis (P_{H^+}/P_{Na^+}) wurde im Beisein von extrazellulären/intrazellulär 2/2 mM $CaCl_2$ und 2/2 mM $MgCl_2$ bestimmt. (siehe Pufferzusammensetzung in Tabelle A.1).

Auswertung der Lichttitration Nach dem Bestimmen der Photostromamplituden durch 300 ms andauernden Lichtpuls mit verschiedenen Lichtintensitäten wurden alle Amplituden auf den Maximalwert normiert. Der lineare Bereich der Lichttitrationskurve diente der Bestimmung des Anstieges (m) und des Schnittpunktes mit der X-Achse (x_e).

Auswertung zeitaufgelöster Fluoreszenzmessungen Die Bildfolgen konnten mit der Tillvision Software dargestellt und analysiert werden. Die einzelnen Zellen und der Hintergrund wurden per Hand mit der Software markiert (ROI). Die zeitliche Veränderung der Gesamtfluoreszenz des jeweiligen ROI konnte über die gesamte Bildfolge analysiert werden.

Der Anstieg der Fluoreszenzamplitude (ΔF) wurde ins Verhältnis zur hintergrundkorrigierten Fluoreszenz gesetzt (F) [84].

$$\frac{\Delta F}{F_o} = (F_{Signal} - F)/F_o \quad (3.15)$$

Alle Fluoreszenzsignale wurden vorher um die Hintergrundfluoreszenz korrigiert.

Der K_D -Wert aus der Dosiswirkungskurve für Mibefradil (siehe Abbildung 4.17) wurde mit der Hill-Gleichung bestimmt [131]:

$$I = \frac{a}{1 + e^{\left(\frac{c-K_D}{b}\right)}} \quad (3.16)$$

4 Ergebnisse

4.1 Saugelektrodenmessungen an *Chlamydomonas reinhardtii*

Elektrische Messungen an einzelnen *C.reinhardtii* Zellen des Wildtypstammes haben sich als sehr schwierig erwiesen, da die starre Zellwand kein ausreichendes Abdichten zwischen Glaselektrode und Zellmembran ermöglicht [11]. Um die notwendigen hohen Widerstände für Saugelektrodenmessungen zu erhalten, wurde ein zellwandloser Stamm (CW2) verwendet. In dem CW2 Stamm ist zwar auch eine Zellwand vorhanden, diese ist aber durch fehlende Quervernetzung deutlich flexibler und wird ins Medium abgegeben [132]. Es konnten Membranabschnitte von $\sim 10 \mu m$ in die Ableitungspipette eingesaugt und dabei Abdichtungswiderstände von $50 - 250 M\Omega$ erzielt werden. Bei Versuchen die eingesogene Membran zu öffnen, um einen direkten Zugang ins Zellinnere zu bekommen, wurden die hohen Abdichtungswiderstände zerstört. Somit kann mittels Saugelektrodenmessung nur die extrazelluläre Ionenkomposition definiert werden. Eine weitere Besonderheit der Saugelektrodenmessung an *C.reinhardtii* im Vergleich zu anderen elektrophysiologischen Techniken ist, dass durch Lichtapplikation nur Ionen über den Augenfleck in die Zelle fließen. Direkte Ströme werden nur gemessen, wenn sich der Augenfleck in der Pipette befindet. Wenn sich der Augenfleck außerhalb der Pipette befindet, führt der lokale Einstrom zwar zum kapazitiven Umlagern der gesamten Membran, aber abgeleitet wird nur der kapazitive Anteil des eingesogenen Membranfleckes. Somit wird mittels dieser Technik nur ein Bruchteil des eigentlichen lichtinduzierten Ladungstransportes gemessen.

Kanalrhodopsine werden in der Grünalge in den verschiedenen Stadien des Zellzyklus unterschiedlich stark exprimiert [133, 121]. Um sicher zu sein, dass sich alle Zellen im

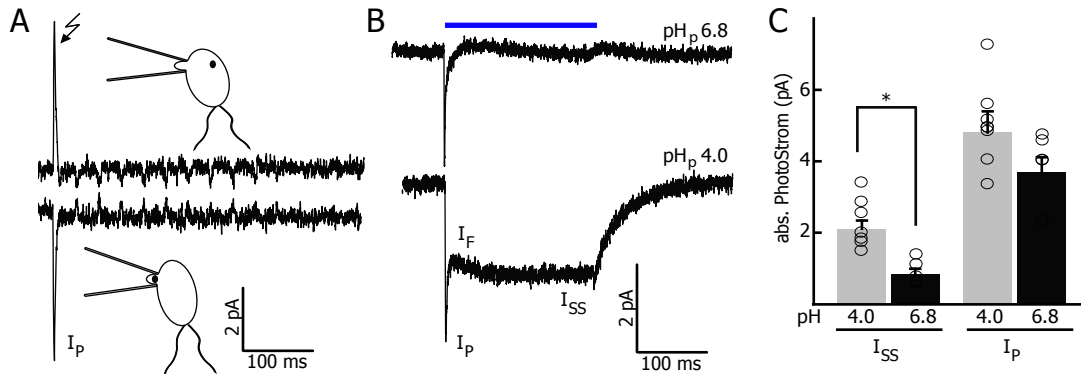


Abbildung 4.1: Saugelektrodenmessungen an *C. reinhardtii* zur Untersuchung der Abhängigkeit vom pH-Wert für den transienten und stationären Photostrom. In **A** sind typische Stromspuren bei einer Blitzmessung (500 μ s, 455 nm LED) bei einem pH_p und pH_e von je 6.8 gezeigt. Der Photostrom (I_P) ist positiv, wenn der Augenfleck außerhalb der Ableitungselektrode ist (*obere Stromspur*) und negativ, wenn der Augenfleck in die Ableitungselektrode eingesogen ist (*untere Stromspur*). **B** zeigt Photostrommessungen mit eingesogenem Augenfleck während eines Lichtpulses von 300 ms bei 470 nm für verschiedene pH_p-Werte. Neben (I_P) sind der Flagellenstrom (I_F) und stationäre Photostrom (I_{SS}) sichtbar. In **C** ist eine quantitative Analyse aus den Messungen in **B** gezeigt.

lichtsensitivsten vegetativen Stadium befinden, wurden sie ~ 12 h vor der Messung in NMM-Medium inkubiert [134]. Der Messpuffer setzte sich aus 100 μ M KCl und 200 μ M CaCl₂ bei einem pH-Wert von 6.8 beziehungsweise 4.0 zusammen (siehe A.1).

Abhängig vom Abdichtungswiderstand betrug der abgeleitete Photostrom (P-Strom) 5 – 60 pA, wie exemplarisch in Abbildung 4.1 **A** gezeigt ist. Die beiden möglichen Messkonfigurationen im Blitzlichtexperiment sind ebenfalls in dieser Abbildung dargestellt. In der oberen Stromspur ist der Augenfleck außerhalb der Pipette, was definitionsgemäß zu einem positiv gerichteten Photostrom führt. Dagegen ist der Photostrom negativ gerichtet, wenn sich der Augenfleck innerhalb der Ableitungspipette befindet (*untere Stromspur*). In beiden Fällen ist der ausgelöste Photostrom nicht ausreichend, um einen Flagellenstrom zu initiieren [134]. Der Flagellenstrom (F-Strom) ist eine Alles-oder-Nichts Reaktion, die bei ausreichender Depolarisierung einsetzt und direkt mit der Veränderung des Schwimmstils der Alge einhergeht. Bei einem 300 ms Belichtungspuls mit 470 nm ist neben dem transienten Photostrom sowohl der Flagellenstrom, sowie auch deutlich der stationäre Anteil zu erkennen (siehe Abbildung

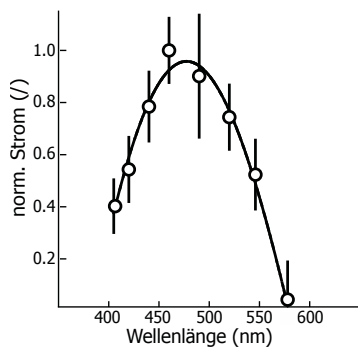


Abbildung 4.2: Wellenlängenabhängigkeit des Photostroms in Gameten von *C.reinhardtii* mittels Saugelektroden. Die verschiedenen Wellenlängen wurden mit BP Filtern selektiert. Die Belichtungsdauer betrug 300 ms bei Messkonfiguration mit eingesogenem Augenfleck. Der maximale transiente Photostrom wird bei einer Wellenlänge von 470 nm erzielt.

4.1 B). Bei einem pH_p von 4.0 nimmt der stationäre Anteil des Photostroms stärker zu als der transiente (siehe Abbildung 4.1 B untere Stromspur). Eine statistische Auswertung der Photostromamplituden für pH_p 6.8 und 4.0 zeigt eine signifikant stärkere Erhöhung der stationären Komponente bei pH_p 4.0 im Gegensatz zu einer nur leichten Erhöhung für den transiente Anteil bei dem selben pH-Wert (siehe Abbildung 4.1 C).

Das Aktionsspektrum in Abbildung 4.2 zeigt Messungen der transienten Stromamplituden bei einer Saugelektrodenmessung in *C.reinhardtii*. Nach Angleichen der Messdaten mit einer Weibull Funktion wurde eine maximale Aktivität bei ~ 470 nm bestimmt.

4.2 Elektrische Messungen an Kanalrhodopsinen in eukaryotischen Zellen

4.2.1 Elektrophysiologische Charakterisierung des Kanalrhodopsin-2 von *Chlamydomonas reinhardtii*

Um die Eigenschaften der ChRs hinsichtlich Kinetik, Wellenlänge, Expression und Ionenpräferenzen besser und genauer studieren zu können als in Grünalgen, wurden Patch-Clamp Untersuchungen in heterologen Expressionssystemen wie HEK293 durchgeführt. Als Negativkontrolle wurden entweder native HEK293 Zellen verwendet oder sie erfolgte durch direkten Vergleich von Messungen mit und ohne Belichtung.

Nach Transfektion der Zellen mit C2 (siehe Abschnitt 3.2.2) konnten je nach angelegtem

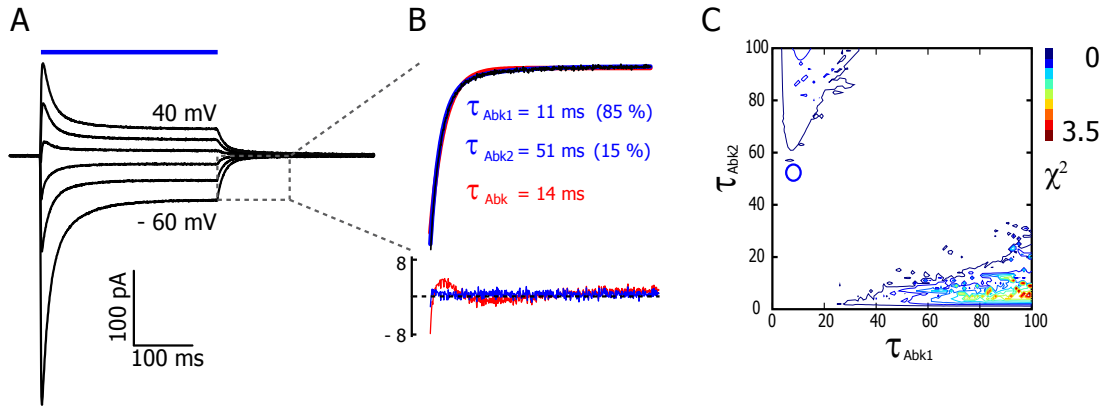


Abbildung 4.3: Stellt Stromspuren von C2 mit einer statistischen Analyse der Abklingkinetik dar. **A** Zeigt exemplarisch lichtinduzierte Stromspuren von C2 bei verschiedenen Spannungen. In **B** ist die aus A vergrößerte Abklingkurve bei - 60 mV mit einer biexponentiellen (blau) und monoexponentiellen (rot) Funktion angeglichen. Die untere Abbildung in B stellt die Residuen, also die x-abhängigen Abweichungen der angeglichen Funktionen von den Originaldaten, dar. In **C** ist die Abweichung einer monoexponentiellen Funktion bei verschiedenen τ -Wertekombinationen von einer biexponentiellen Funktion in Form von χ^2 als Konturdiagramm dargestellt. Die τ -Werte der biexponentiellen Funktion variieren dabei von 1 – 100 ms. Die τ Kombination aus B ist mit einem blauen Kreis markiert.

Membranpotential einwärts- und auswärtsgerichtete Photoströme induziert werden (siehe Abbildung 4.3 A). Der durchschnittliche Photostrom $I_{Spitze, -60mV, pH7.2, 140mMNaCl}$ liegt bei $-0.8 \pm 0.04 \text{ nA}$. Des Weiteren fällt die starke Inaktivierung von $72 \pm 16 \%$ auf. Die Abklingkinetik wird in den meisten anwendungsbezogenen Untersuchungen monoexponentiell beschrieben (siehe Gleichung 3.7) [135, 111, 34, 136, 58, 137]. In wenigen, rein mechanistischen Studien wird die Kinetik biexponentiell beschrieben [48, 138]. Ein Vergleich beider Modelle mit den Originaldaten ist in Abbildung 4.3 B gezeigt. Ein monoexponentielles Modell weicht zwar systematisch von den Originaldaten ab, wie in der Resuidendarstellung zu erkennen ist, aber τ_{Abk} liegt mit 14 ms sehr nahe an τ_{Abk1} mit 11 ms. Diese erste, schnelle Komponente beim biexponentiellen Modell beschreibt 85% der gesamten Abklingkurve. In C sind die systematischen Abweichungen durch den Gütefaktor χ^2 ausgedrückt, die auftreten wenn verschiedene Kombinationen von τ_{Abk1} und τ_{Abk2} an simulierte monoexponentielle Daten angeglichen werden. Nur bei extremen Kombinationen, bei denen beide τ -Werte, τ_{Abk1} und τ_{Abk2} , sehr unterschiedlich

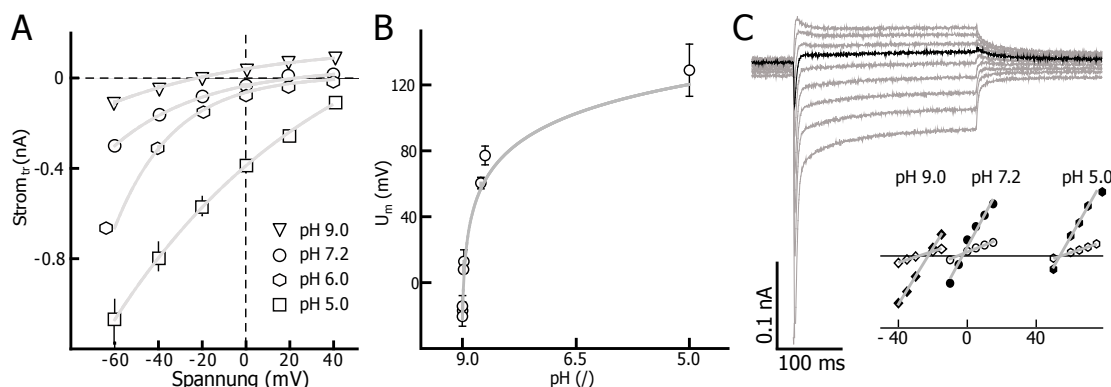


Abbildung 4.4: Untersuchungen der H^+ - und Na^+ Leitfähigkeit im C2. In **A** sind Strom-Spannungskurven bei verschiedenen pH_e -Werten dargestellt. Die daraus erhaltenen U_{Ukp} wurden gegen die pH_e -Werte aufgetragen (**B**). Die Korrelation konnte an die vereinfachte Form der Goldman-Gleichung (siehe Gleichung 3.13) approximiert werden. Das Permeabilitätsverhältnis für C2 beträgt demnach $3.6 \pm 0.81 \cdot 10^6$. **C** zeigt Stromspuren von C2 bei pH 9.0 mit 140 mM NaCl für verschiedene Membranspannungen ($\Delta U = 5$ mV) in der Nähe von U_{Ukp} . Die schwarze Stromspur zeigt exemplarisch einen einwärtsgerichteten transienten Strom mit einem auswärtsgerichteten stationären. Als Innenbild sind die Strom-Spannungskennlinien in der Nähe des Umkehrpotentials für den transienten (schwarze Symbole) und stationären (weiße Symbole) Strom bei verschiedenen pH Werten illustriert.

sind, kommt es zu starken Abweichungen. Die Fläche des Konturdiagrammes, in denen es zu ähnlich geringen χ^2 Abweichungen wie in Abbildung 4.3 **B** kommt, liegt bei ~ 82 %.

Eine erste Charakterisierung von C2 wurde bereits 2003 in HEK Zellen und *X. laevis* Oozyten durchgeführt [20]. Die hier präsentierten elektrischen Messungen an C2 dienten somit auch zur Kontrolle der Messapparaturen, um die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Experimente einschätzen zu können. Durch die Ganzzellaufleitung in HEK Zellen konnten nun auch definierte ionale Bedingungen getestet werden. In Abbildung 4.4 **A** sind Strom-Spannungskennlinien für den transienten Anteil des Photostroms bei verschiedenen pH-Werten gezeigt. Die Umkehrpotentiale konnten mittels Gleichung 3.10 bestimmt werden. Aus der Abhängigkeit der Umkehrpotentiale von der Ionenkonzentration konnte das Verhältnis der Permeabilitäten zweier Ionensorten zueinander errechnet werden, wobei auch die Konzentration der nicht veränderte Ionensorten ein Einfluß auf das

Permeabilitätsverhältnis hat (siehe Abschnitt 3.5). In 4.4 **B** ist diese Korrelation der Umkehrpotentiale zu den pH-Werten dargestellt. Dieser Zusammenhang wird durch die vereinfachte Form der GHK Gleichung beschrieben (siehe Gleichung 3.13). Es wurde ein Permeabilitätsverhältnis von $3.6 \pm 0.81 \cdot 10^6$ bestimmt. Das bedeutet, dass H^+ -Ionen ~ 4 Millionen mal besser geleitet werden als Na^+ -Ionen [138]. Nahe dem Umkehrpotential wurde ein interessantes Phänomen beobachtet. Die schwarze Stromspur in 4.4 **C** zeigt einen einwärtsgerichteten transienten Strom und einen auswärtsgerichteten stationären. Eine genauere Untersuchung der Stromamplituden nahe dem Umkehrpotential für pH 9.0, pH 7.2 und pH 5.0 ist im Innenbild von 4.4 **C** gezeigt. Die Umkehrpotentiale des transienten Photostromes werden bei positiveren Membranspannungen als bei denen des stationären Photostromes erreicht. Insbesondere bei geringen H^+ Konzentrationen von $10^{-9} M$ unterscheiden sich die Umkehrpotentiale $\Delta U_{U_{kpt} - st, pH 9.0}$ um $9 \pm 1 mV$. Bei höheren H^+ Konzentrationen wird die Differenz kleiner und verschwindet bei H^+ Konzentration von $10^{-5} M$ ganz. In Zusammenarbeit mit Dietrich Gradmann wurde dieses Phänomen genauer untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die offenen Zustände O_1 und O_2 verschiedene Selektivitäten für H^+ und Na^+ besitzen. Die H^+ Permeabilität im Vergleich zur Na^+ Permeabilität des O_1 Zustandes ist ~ 2 x geringer als die des O_2 Zustandes [138].

4.2.2 Erstmalige elektrophysiologische Charakterisierung der Kanalrhodopsine 1 und 2 aus *Volvox carteri*

Volvox Kanalrhodopsin-1

Die *VOP3* und *VOP4* kodierenden mRNS wurden von der Arbeitsgruppe Pflanzenphysiologie um Prof. Hallmann mittels Datenbankvergleichen und reverser Transkription aus *V. carteri* identifiziert [13]. Beide Gene wurden aufgrund ihres hohen GC-Anteils und einigen seltenen Kodons in eine typisch menschliche DNS umgeschrieben (*hvop1* und *hvop2*). Beide Gene wurden jeweils mit mCherry beziehungsweise eGFP fusioniert und in HEK293 Zellen exprimiert.

Im Falle von hV1-mCherry konnten lichtinduzierte Ströme bei 560 nm

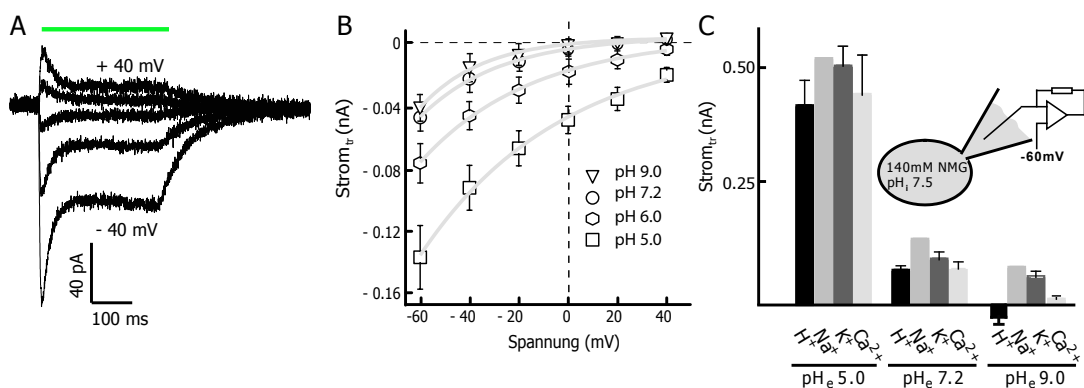


Abbildung 4.5: Untersuchung der Ionenpräferenz von hV1-mCherry in HEK293 Zellen mittels Patch-Clamp. **A** zeigt charakteristische Photostromprofile bei verschiedenen Spannungen und bei einer Belichtung von 560 nm (pH_e 7.2 NaCl 140 mM). In **B** sind Strom-Spannungskurven für verschiedene pH_e -Werte gezeigt. Aus den Umkehrpotentialen ergibt sich ein P_{H^+}/P_{Na^+} von $4.5 \pm 1.1 \cdot 10^6$. In **C** sind Photostromamplituden für H^+ (NMG^+), Na^+ , K^+ und Ca^{2+} bei -60 mV in Abhängigkeit von pH_e gezeigt. Der intrazelluläre Pipettenpuffer betrug hierbei immer 110 mM NaCl mit einem pH_i von 7.5.

ausgelöst werden. Die mittlere Photostromamplitude in einer Ganzzelleableitung, $I_{\text{Spitze}, -60\text{mV}, \text{pH} 7.2, 140\text{mM NaCl}}$, betrug -0.3 ± 0.06 nA. Die Stromspuren bei verschiedenen Spannungen (siehe Abbildung 4.5 **A**) zeigen ein leichtes Überspringen des stationären Photostroms, der erst bei Belichtung ≥ 500 ms in einen konstanten stationären Strom übergeht (nicht gezeigt). Die Inaktivierung beträgt 38 ± 8 % und ist somit ungefähr um die Hälfte kleiner als bei C2 und liegt somit im Bereich von C1 (siehe Tabelle 1.3) [121, 46]. Die Strom-Spannungskurven aus Abbildung 4.5 **B** bei variierenden pH_e -Werten besitzen im Vergleich zu C2 (siehe Abbildung 4.4 **A**) positivere Umkehrpotentiale. Das P_{H^+}/P_{Na^+} Verhältnis liegt bei $4.5 \pm 1.1 \cdot 10^{-6}$ und ist somit $\sim 1/4$ x größer als bei C2. Wegen der geringen Expression in HEK Zellen wurde das Verhältnis P_{H^+}/P_{Na^+} für C1 nicht bestimmt. Aber wie durch ähnliche Untersuchungen von C1 in Oozyten wie in Abbildung 4.5 **C** dargestellt, scheint die Permeabilität für H^+ leicht höher zu sein als in C2. Auch das Balkendiagramm in Abbildung 4.5 **C** zeigt für V1, dass H^+ am besten geleitet werden. Zwar erhöhen sich die Photostromamplituden bei Zugabe von Na^+ , K^+ beziehungsweise Ca^{2+} , aber bei pH-Werten ≤ 7.2 ist der Anteil von H^+ Ionen getragenen Photostrom deutlich ≥ 50 %. Erst bei einem pH_e von 9.0 ist der insgesamt

deutlich kleinere Photostrom vorrangig von monovalenten Kationen oder Kalzium getragen. Bei pH_e 9.0 beträgt der $\Delta I_{(I_{Na^+} - I_{H^+})} = 0.104 \text{ nA}$ und ist Na^+ getragen. Interessanterweise ist bei pH_e 9.0 bereits ein H^+ Ausstrom bei -60 mV zu beobachten (*schwarzer Balken*). Trotzdem ist bei physiologischen pH-Werten die gleiche Tendenz der Permeabilitäten zu erkennen wie bei C1 und C2: $P_{H^+} \gg P_{Na^+} > P_{K^+} > P_{Ca^{2+}}$.

V1 besitzt eine maximale Absorption von $535 \pm 5 \text{ nm}$. Hierbei fällt die Breite des Aktionsspektrums auf. Das Spektrum kann nur mit Hilfe zweier Gaußskurven gut angenähert werden (siehe Abbildung 4.5 **A** scharze Linie). Hierbei haben die beiden Gaußskurven (graue Linie) jeweils eine Halbwertsbreite von $\sim 90 \text{ nm}$. Das hypsochrome Maximum liegt bei $483 \pm 3 \text{ nm}$ und das bathochrome bei $546 \pm 4 \text{ nm}$. Das Aktionsspektrum verschiebt sich bei basischen pH_e -Werten auf $515 \pm 5 \text{ nm}$ (nicht gezeigt). Der Bereich der Lichttitration zwischen $0.8 - 10 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ wurde mit einer Geradengleichung angenähert. Der Schnittpunkt mit der X-Achse liegt hier bei $0.22 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ und besitzt eine Steigung von $0.0467 (\text{mW} \cdot \text{cm}^{-2})^{-1}$. Die Photostromprofile bei verschiedenen Lichtleistungen sind als Innenbild in Abbildung 4.6 **B** dargestellt. Wie in Abschnitt 1.2.3 exemplarisch beschrieben, vergrößert sich auch bei V1 für geringe Lichtintensität der t_{max} -Wert und τ_{Iak} . Das Überschwingen des stationären Stroms wird bei geringen Lichtintensitäten flacher.

Der τ_{Erk} von V1 (siehe Abbildung 4.6 C) konnte mit Gleichung 3.9 eindeutig bestimmt werden und lag bei einem pH von 7.2 und 0 mV bei $14.5 \pm 1.3 \text{ s}$. Nach Ausschalten der Belichtung kehrte V1 mit einem $\tau_{Abk} = 77 \pm 8 \text{ ms}$ in den Dunkelzustand zurück (siehe Abbildung 4.5 **A** und 4.6 **B**).

Volvox Kanalrhodopsin-2

Die Charakterisierung von V2 erfolgte mittels der gleichen Experimenten wie sie auch für V1 durchgeführt wurden (siehe Abschnitt 4.2.2). In Abbildung 4.7 **A** sind Photostromprofile für V2 bei verschiedenen Spannungen dargestellt. Der Photostrom war im Vergleich zu V1 2 x größer und lag im Mittel bei $I_{Spitze, -60\text{mV}, \text{pH} 7.2, 140\text{mMNaCl}} = -0.615 \pm 78 \text{ nA}$. Im Vergleich zu V1 ist kein Überschwingen des stationären Photostroms

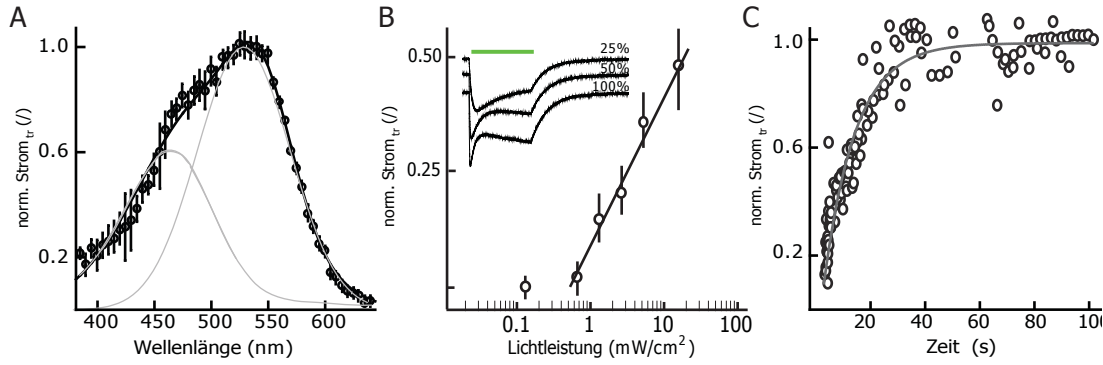


Abbildung 4.6: Patch-Clamp Untersuchungen von hV1-mCherry hinsichtlich Absorption, Lichtsensitivität und Erholungskinetik. In **A** ist das Aktionsspektrum bei pH_e 7.2 für V1 gezeigt. Die *schwarze*, durchgezogene Linie ist die Summe der beiden *grau* durchgezogenen Gaußkurven. Das globale Maximum der schwarzen Kurve liegt bei $535 \pm 5 \text{ nm}$. Die Lichtabhängigkeit des Photostroms ist in **B** gezeigt. Die auf die Sättigung normierten Photostromamplituden konnten im linearen Bereich mit einer Geradengleichung ($m = 0.0467 \text{ (mW} \cdot \text{cm}^{-2})^{-1}$, $x_e = 0.22 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$) angenähert werden. Als Innenbild sind exemplarisch gemittelte Stromspuren bei 17, 9 und 4 $\text{mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ gezeigt (normierter Photostrom, grüner Belichtungsbalken entspricht 300 ms). **C** illustriert die Erholungskinetik für V1 bei pH_e 7.2 und einer Belichtung von 560 nm. Der $\tau_{\text{Erk},0\text{mV}}$ beträgt $14.5 \pm 1.3 \text{ s}$.

zu erkennen (Abbildung 4.5 **A**). Damit ähnelt der Stromverlauf stark dem von C2. Nach Ausschalten des Lichtes erhöht sich der stationäre Photostrom kurzzeitig um $\sim 5 \%$ des transienten Photostroms. Dieses kurzzeitige Erhöhen der Leitfähigkeit ist von der Membranspannung abhängig und kann einwärts- oder auswärtsgerichtet sein.

Der τ_{Abk} betrug $56 \pm 8 \text{ ms}$ und lag somit zwischen dem von C2 und V1. Die Strom-Spannungskennlinien ähnelten jenen von C2, was sich daher auch in einem ähnlichen $P_{\text{H}^+}/P_{\text{Na}^+}$ Verhältnis von $2.9 \pm 0.9 \cdot 10^6$ manifestiert (siehe Abbildung 4.7 **B**). Das Balkendiagramm (siehe Abbildung 4.7 **C**) weist die für ChR typische Reihenfolge der geleiteten Kationen auf. Der $\Delta I_{(I_{\text{H}^+} - I_{\text{Na}^+})}$ für pH_e 9.0 beläuft sich zwar auch auf $\sim 150 \text{ nA}$ leicht größer als im V1. Auch ist der Photostrom bei -60 mV nicht auswärtsgerichtet wie bei V1, sondern immernoch einwärtsgerichtet. Beide Indikatoren ($P_{\text{H}^+}/P_{\text{Na}^+}, \Delta I_{(I_{\text{H}^+} - I_{\text{Na}^+})}$) sprechen also dafür, dass V2 eine höhere Leitfähigkeit für monovalente Kationen besitzt. Wie auch im Falle von V1 erhöht sich der Photostrom beim Wechseln von pH_e 7.2 auf 5.0 um das 3 – 4 fache.

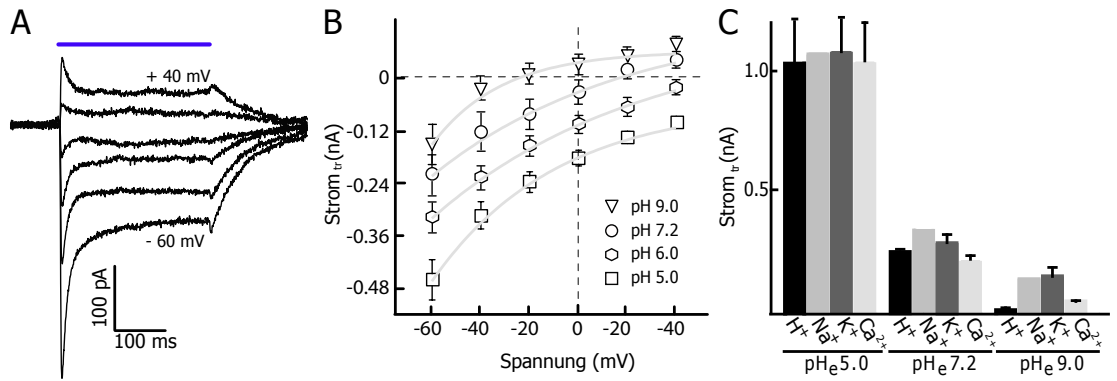


Abbildung 4.7: Lichtinduzierte Ionenpräferenz von transfizierten hV2- eGFP HEK293 Zellen. **A** zeigt exemplarisch Photostromprofile bei verschiedenen Membranspannungen bei einer Belichtung mit 460 nm (pH_e 7.2 NaCl 140 mM). Zu beobachten ist eine kleine Stromspitze nach Ausschalten des Lichtes. In **B** sind Strom-Spannungskurven bei verschiedenen pH_e-Werten dargestellt. Das daraus errechnete P_{H^+}/P_{Na^+} beträgt $2.9 \pm 0.9 \cdot 10^6$. Die Ionenpräferenz bei -60 mV für H^+ , Na^+ , K^+ und Ca^{2+} bei verschiedenen pH_e-Werten ist in **C** gezeigt.

Die maximale Absorption von V2 liegt bei 462 ± 2 nm und somit im ähnlichen spektralen Bereich wie C2. Die Parameter für die Lichtsensitivität sind für V2 im Vergleich zu V1 flacher ($m=0.01$ ($mW \cdot cm^{-2}$)⁻¹) und schneiden die X-Achse bei 0.15 $mW \cdot cm^{-2}$ (siehe Abbildung 4.8 B). Die Erholungskinetik lag bei $\tau_{Erk,0mV}=17.3 \pm 2.2$ s und somit in dem Bereich von V1 (Vergleiche Abbildung 4.6 C und 4.8 C).

Die Größe der Photostromamplituden der jeweiligen Konstrukte lassen sich qualitativ mit ihrer Membranständigkeit in Verbindung bringen. Die konfokalen Fluoreszenzaufnahmen in Abbildung 4.9 verdeutlichen diesen Zusammenhang. Die Konstrukte hC2-mCherry und hV2-eGFP sind qualitativ deutlicher in die Plasmamembran der HEK293 Zellen lokalisiert als hV1-eCFP (mittlere Stromamplituden: C2 0.8 nA, V2 0.62 nA und V1 0.3 nA). Durch die hohe axiale Auflösung in der konfokalen Mikroskopie kann eine Fokussierung auf die Membran wie eine plasmatische Lokalisierung wirken. Erst durch den Vergleich mit dem Transmissionsbild kann die Fokussierung abgeschätzt werden.

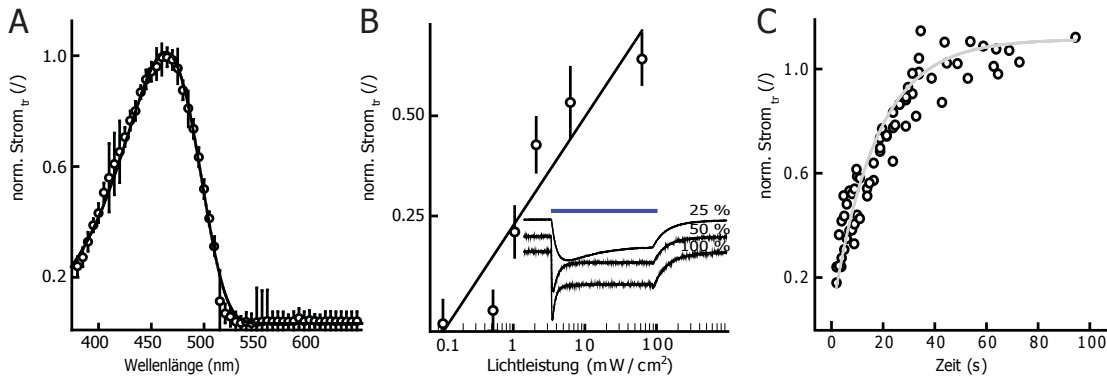


Abbildung 4.8: Untersuchung der Absorption, Lichtsensitivität und Erholungskinetik von hV2-eGFP. Die Abhängigkeit des Photostromes von der Wellenlänge für V2 ist in **A** gezeigt. Das Spektrum kann mit einer Weibull Funktion gut rekonstruiert werden und besitzt eine maximale Absorption bei $462 \pm 1 \text{ nm}$. Die Abhängigkeit der Photostromamplitude von der Lichtleistung ist in **B** dargestellt. Der lineare Bereich wird mit einer Geradengleichung ($m = 0.01 (\text{mW} \cdot \text{cm}^{-2})^{-1}$, $x_e = 0.15 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$) gut nachvollzogen. Im Innenbild sind exemplarisch gemittelte Stromspuren bei 80 , 40 und $20 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ dargestellt (blauer Belichtungsbalken entspricht 300 ms). **C**, die Erholungskinetik wurde für V2 unter lichtsättigenden Bedingungen bei 460 nm bestimmt. Unter diesen Bedingungen und einem pH_e von 7.2 besitzt die Erholungskinetik einen $\tau_{\text{Erk},0\text{mV}}$ von $17.3 \pm 2.2 \text{ s}$.

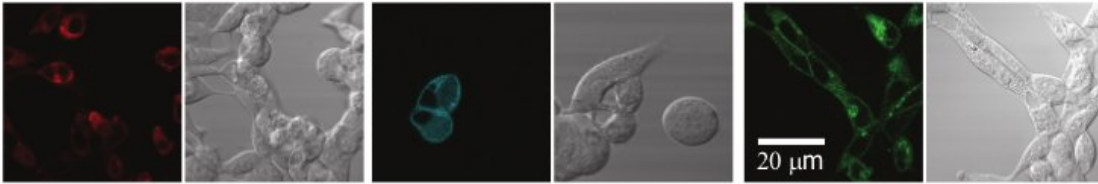
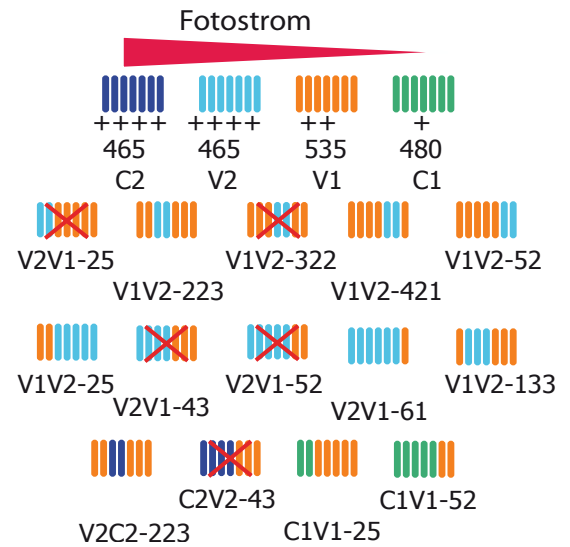


Abbildung 4.9: Konfokale Bilder zum Überprüfen der Membranständigkeit für C2, V1 und V2 in HEK293 Zellen. Bildpaare zeigen Fluoreszenz- und Transmissionsaufnahmen von hC2-mCherry (*Links*), hV1-eCFP (*Mitte*) und hV2-eGFP (*Rechts*).

4.3 Farbverschiebung von Kanalrhodopsinen

Um einzelne Mutationen hinsichtlich ihres Einflusses auf die Absorption zu untersuchen, sind gut exprimierende und membranintegrierte ChR Varianten vorteilhaft, da bei ihnen das Signal-Rausch-Verhältnis und die Reproduzierbarkeit erhöht sind. In verschiedenen Studien konnte durch Austauschen verschiedener Helices zwischen C1 und C2 die Photostromamplitude vergrößert werden [46, 58, 111]. Des Weiteren könnten bei einem analogen Ansatz zwischen V1 und V2 auch kritische Aminosäuren, die für

Abbildung 4.10: Illustriert die Zusammensetzung der aus den nativen ChR abgeleiteten Chimären. Für die nativen ChRs sind die maximalen Absorptionen in *nm* angegeben und die Photostromamplitude ist durch die Anzahl von '+' skaliert. Der Anfangsbuchstabe des Namens bezieht sich auf die Herkunft der ersten Helix, der zweite Buchstabe auf die Herkunft des eingeführten ChR-Stückes. Die Anzahl der jeweiligen Helices sind in der gleichen Reihenfolge hinter der Herkunftsbezeichnung angefügt.



den Absorptionsunterschied von ≥ 70 *nm* verantwortlich sind, auf die jeweilige Helix zurückgeführt werden.

4.3.1 Design und Charakterisierung von Kananrhodopsinchimären

Im Experiment wurde der Einfluss von eingebrachten fremden Helices auf ihre Wirkung hinsichtlich der Absorption, normalisierten Photostromamplitude (Stromdichte) und Abklingkinetik untersucht. In der 1. Reihe der Abbildung 4.10 sind noch einmal alle nativen ChRs mit ihrer maximalen Absorption und Photostromamplituden illustriert. Die größten Amplituden besaßen C2 und V2, wobei beide ChRs im blauen Wellenlängenbereich absorbieren. Um innerhalb einer Spezies zu bleiben, wurden erstens systematisch 2 Helices von V2 mit den jeweiligen von V1 ausgetauscht (siehe 2. Reihe Abbildung 4.10). Die beiden Konstrukte V2V1-25 und V1V2-322 sind zwar membranständig lokalisiert (nicht gezeigt), aber besitzen dennoch keinen Photostrom. Dagegen sind die Konstrukte V1V2-223, V1V2-421 und V1V2-52 funktionell und konnten daher elektrophysiologisch charakterisiert werden. Das Konstrukt V1V2-223 zeigt ein ähnlich hypsochrom verbreitertes Absorptionsspektrum wie V1. Die beiden Maxima liegen bei 458 und 564 *nm* (siehe Tabelle 4.1). Auch die Abklingkinetik liegt im Bereich von V1. Trotz einer scheinbar besseren Membranständigkeit (nicht gezeigt) ist die

Chimäre	λ_{max} (nm)	J ($pA \cdot pF^{-1}$)	τ_{Abk} (ms)	$\tau_{Abk,ima}$ (ms)
C2	465 ± 2	47 ± 9	21 ± 2	9 ± 1
V2	462 ± 2	35 ± 15	56 ± 8	/
V1	$488 \pm 6/546 \pm 1$	13 ± 6	77 ± 8	/
C1	478 ± 2	10 ± 1	23 ± 3	/
***V1V2-223	$485 \pm 14/550 \pm 2$	17 ± 6	71 ± 45	/
**V1C2-223	$458 \pm 13/564 \pm 2$	21 ± 8	120 ± 63	/
*V1V2-52	458 ± 1	48 ± 19	812 ± 123	/
V1V2-421	$486 \pm 13/544 \pm 5$	31 ± 15	28 ± 21	/
V1V2-25	463 ± 1	51 ± 21	48 ± 13	16 ± 2
V2V1-61	475 ± 2	8 ± 7	53 ± 21	/
V1V2-133	$478 \pm 7/541 \pm 6$	15 ± 8	63 ± 34	/
C1V1-25	539 ± 4	61 ± 10	130 ± 17	70 ± 3
C1V1-52	501 ± 2	9 ± 4	31 ± 14	/

Tabelle 4.1: Auflistung wichtiger Parameter wie Expression, Absorption und Kinetik für die nativen ChRs und die aus ihnen abgeleiteten ChR Chimären. Der dargestellte Mittelwert setzt sich aus ≥ 3 Messungen zusammen. Die Konstrukte in den grau unterlegten Zeilen wurden mit 560 nm aktiviert. Alle anderen Konstrukte wurde bei 460 nm angeregt. Bei sehr breiten Aktionsspektren wurde das Maximum nicht mit einer Weibull Funktion angeglichen, sondern mit der Summe zweier Gaußkurven. In diesem Fall wurden beide Maxima angegeben.

(* Konzeption und molekulargenetische Realisierung M.Prigge, Elektrophysiologische Charakterisierung F.Schneider und M.Prigge., ** Konzeption M.Prigge, molekulargenetische Realisierung M.Prigge und F. Schneider, Elektrophysiologische Charakterisierung F.Schneider und M.Prigge.), *** Konzeption und molekulargenetische Realisierung S.Tsunoda, Elektrophysiologische Charakterisierung F.Schneider und M.Prigge.

Stromdichte nicht signifikant höher als bei V1 [139].

Die Chimäre V1V2-421 weist auch ein verbreitertes Spektrum auf, wobei die langwelligere Schulter im Vergleich zum V1V2-223 Konstrukt leicht blau verschoben ist.

Das Aktionsspektrum vom V1V2-52 Konstrukt ähnelt stark dem Spektrum von V2 und besitzt eine maximale Absorption bei 470 nm . Die Stromdichte ist $\sim 4 \times$ höher als die von V1 und somit sogar leicht verbessert gegenüber V2 (Vergleiche in Tabelle 4.1 V2 und V1V2-52). Auch der τ_{Abk} von $48 \pm 19 \text{ ms}$ ist im Bereich von V2.

Basierend auf den Ergebnissen der Chimären aus Reihe 2, insbesondere von V1V2-223, das weiterhin die rotverschobene Absorption von V1, aber mit einer besseren Membranintegration besitzt, wurden die Konstrukte der Reihe 3 konzipiert (siehe

Abbildung 4.10). Hierbei wurde versucht, den Anteil von V2 Helices zu erhöhen, um Expression weiter zu verbessern. Die beiden Chimären V2V1-43 und V2V1-52, die also N-terminal mit V2 Helices beginnen, waren nicht funktionell. Wurde der Anteil von V2 auf 6 Helices wie im Konstrukt V2V1-61 erhöht, entstand eine funktionelle ChR Variante. Gleichwohl lag hier die Stromdichte lediglich bei $8 \pm 7 \text{ pA} \cdot \text{pF}^{-1}$. Die Absorptions- und Geschwindigkeitsparameter ähnelten denen von V2 (siehe Tabelle 4.1).

Die Chimäre V1V2-25 besaß eine größere Stromdichte als V2 und C2 ($51 \pm 21 \text{ pA} \cdot \text{pF}^{-1}$). Das Konstrukt wies auch eine hohe Membranständigkeit auf (nicht gezeigt). Kinetik und Absorption ähnelten denen von V2 (siehe Tabelle 4.1).

Im Konstrukt V1V2-133 wurde lediglich die Helix B von V2 ausgehend von V1V2-223 eingetauscht. Dieses V1V2-133 Konstrukt besaß ähnliche Parameter wie V1V2-223 beziehungsweise V1 (siehe Tabelle 4.1). Erwähnenswert ist die leichte Blauverschiebung der bathochromen Schulter des verbreiterten Absorptionsspektrums im Vergleich zu V1. In der letzten Reihe in der Abbildung 4.10 sind die Varianten dargestellt in denen Helices von V1 mit Helices von C2, beziehungsweise C1, ausgetauscht worden. Wie auch die entsprechende V2 basierte Chimäre ist das C2V1 43 Konstrukt nicht funktionell. Das Konstrukt V1C2-223 besitzt eine hohe Sequenzhomologie zu dem Konstrukt V1V2-223 (C2: S142K, N143D, S146N, R148K, G151R, I157V, S166A in Richtung V1C2 \rightarrow V1V2). Die Photostromamplitude und Abklingkinetik der beiden 223 Konstrukte sind vergleichbar. Das Aktionsspektrum von V1C2-223 ist aber $\sim 20 \text{ nm}$ breiter als im Falle von V1V2-223 (siehe Tabelle 4.1).

Beide Konstrukte mit N-terminalen C1 Helices, C1V1-25 und C1V1-52 besaßen eine sehr hohe Membranständigkeit (siehe Abbildung 4.11). Die Chimäre C1V1-52 wies aber trotz dieser Membranständigkeit überraschenderweise nur eine Stromdichte von $9 \text{ pA} \cdot \text{pF}^{-1}$ auf. Der τ_{Abk} lag bei $\sim 31 \text{ ms}$ und ist somit 3 x schneller als derjenige von V1. Bei dem Konstrukt C1V1-25, in dem der Anteil der C1-Helices N-terminal von 5 auf 2 im Vergleich zu C1V1-52 reduziert wurde, nahm die Stromdichte deutlich zu und betrug $\sim 61 \text{ pA} \cdot \text{pF}^{-1}$. Damit ist sie $3/2$ x höher als die Stromdichte von C2. Die maximale Absorption liegt bei 539 nm und ist damit um 4 nm bathochrom verschoben gegenüber

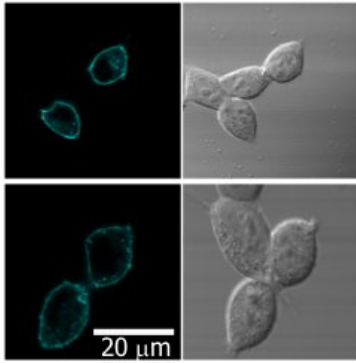


Abbildung 4.11: Illustriert die Membranständigkeit der C1V1 Chimären. Oberes Bildpaar stammt von C1V1-52 und unteres Bildpaar von C1V1-25.

V1 (siehe Tabelle 4.1). Das Spektrum besitzt auch keine hypsochrome Schulter.

Aufgrund dieser hohen Stromdichte und unter Beibehalten der langwelligen Absorption wurde nach ausführlicher Charakterisierung C1V1 als Ausgangspunkt weiterer Mutationsstudien genutzt.

4.3.2 Charakterisierung vom C1V1-25

Die Chimäre C1V1-25, die im Folgendem nur noch C1V1 genannt wird, zeichnet sich durch eine hohe Photostromamplitude von $1.3 \pm 0.3 \text{ nA}$ aus. Der τ_{Abk} liegt bei einem pH-Wert von 7.2 bei $130 \pm 17 \text{ ms}$. Der τ_{Iak} von C1V1 ist mit $192 \pm 20 \text{ ms}$ 3 x langsamer als der von C2 ($\tau_{Iak} = 65 \pm 9 \text{ ms}$, Vergleiche Abbildung 4.3 A und 4.12 A). Des Weiteren ist in Abbildung 4.12 A auch die geringere Inaktivierung mit nur $36 \pm 3 \%$ zu erkennen. Sie ist $\sim 2 \text{ x}$ kleiner als bei C2 und ähnelt jener von V1.

Das Verhältnis P_{H^+}/P_{Na^+} beträgt $4.1 \pm 1.0 \cdot 10^6$ und liegt trotz des großen Standardfehlers eher im Bereich von V1. Auch beim Vergleich der in Abbildung 4.13 C gezeigten transienten Photostromamplituden für unterschiedliche extrazelluläre Ionenbedingungen fällt die Ähnlichkeit mit V1 auf. Insbesondere der Auswärtsstrom bei pH 9.0 für NMG^+ konnte bisher nur bei V1 beobachtet werden. Beide Parameter deuten auf eine höhere H^+ Leitfähigkeit von C1V1 im Vergleich zu C2 hin.

Das Aktionsspektrum besitzt einen λ_{max} von $539 \pm 4 \text{ nm}$ und ist daher zur Zeit das ChR mit der langwelligsten Absorption. Des Weiteren besitzt das Spektrum von C1V1 keine hypsochrome Schulter und hat eine halbmaximale Breite von $\sim 110 \text{ nm}$. Somit

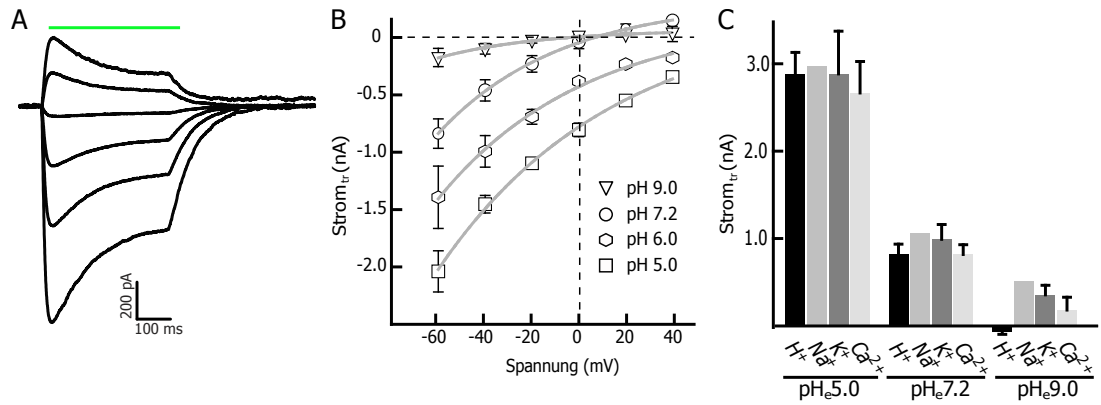


Abbildung 4.12: Hier werden die Untersuchungen der Ionenpräferenz von C1V1 zusammengefasst. **A** zeigt typische Photostromprofile bei einem 300 ms Belichtungspuls mit 560 nm für C1V1 bei einem pH_e von 7.2 und verschiedenen Membranspannungen. In **B** sind Strom-Spannungskennlinien für C1V1 bei verschiedenen extrazellulären pH-Werten mit jeweils 140 mM NaCl dargestellt. **C** verdeutlicht die Abhängigkeit der transienten Photostromamplituden bei -60 mV und verschiedenen ionalen Zusammensetzung der extrazellulären Lösung.

ist das C1V1 Spektrum im Vergleich mit V1 um 20 nm schmaler. Im Gegensatz zu V1, das nur hinreichend genau mit 2 Gausskurven angeglichen werden konnte, kann das C1V1 mit einer einzelnen Weibull Funktion ausreichend genau nachvollzogen werden ($R^2 \geq 0.98$, Vergleiche Abbildung 4.13 **A** und 4.6 **A**). Interessanterweise zeigt C1V1 bei pH 9.0 eine hypsochrome Verschiebung auf $\lambda_{max,9.0} 514 \pm 3$ nm. Das mit dem Laser aufgenommene Aktionsspektrum (siehe Abbildung 4.13 **A** rote Symbole) besitzt eine große Übereinstimmung mit dem am Polychrome aufgenommenen (schwarze Symbole). Lediglich an der blauen und roten Flanke sind kleinere Abweichungen zu erkennen. Gerade in diesen schwächer absorbierenden Bereichen führen schwankende Laserintensitäten durch die Temperaturabhängigkeit des Lasers zu größeren Streuungen. Beim Vergleich der Lichtsensitivität scheinen die am Blitzexperiment bestimmten Werte für C1V1 um $\sim 1.1 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ insensitiver zu sein, als die durch längere Lichtpulse bestimmten Werte. Für diese Abweichung sind höchstwahrscheinlich Ungenauigkeiten zwischen dem Joulemeter für die Bestimmung der der Laserleistung und dem Optometer für Xenon-Lampe verantwortlich. Die Erholungskinetik bei neutralem pH-Wert und bei

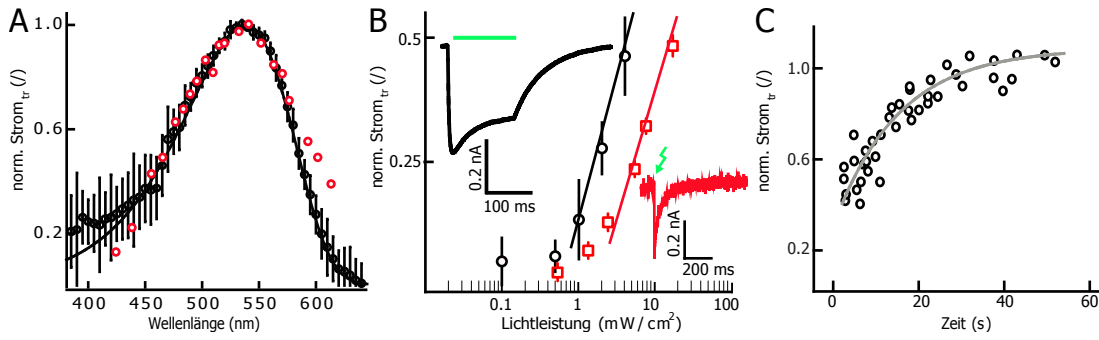


Abbildung 4.13: Exemplifiziert kinetische und spektrale Eigenschaften von C1V1. **A** zeigt das Aktionsspektrum bei einem pH_e 7.2 und einer Pulsdauer von 10 ms (Polychrome, *schwarze Punkte*). Die Messung des *roten* Spektrums erfolgte am Lasersystem mit 10 ns Blitzen. Die Polychrome-Daten sind mit einer Weibull Funktion gut beschrieben (siehe Abschnitt 3.5, $R^2 > 0.98$). Die maximale Absorption liegt bei 539 ± 4 nm. In **B** ist die Lichtsensitivität am Polychrome- und Lasersystem dargestellt. Exemplarisch sind die Stromspuren bei der jeweiligen Belichtung gezeigt. Es wurde lediglich der lineare Bereich angenähert (schwarz 3 Punkte, rot 4 Punkte). Für das Polychrome-System ergibt sich $m = 0.083 (\text{mW} \cdot \text{cm}^{-2})^{-1}$, $x_e = 0.65 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ und für das Lasersystem $m = 0.073 (\text{mW} \cdot \text{cm}^{-2})^{-1}$, $x_e = 1.7 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$. In **C** ist die Erholungskinetik bei pH_e 7.2 und 0 mV gezeigt und beträgt 11 ± 3 s.

einer Membranspannung von 0 mV beträgt 11 ± 3 s (siehe Abbildung 4.13 **C**). Die Erholungskinetik beschleunigt sich bei negativen Membranspannungen kontinuierlich bis zu einem $\tau_{\text{Erk}, -60\text{mV}}$ von 4 ± 0.3 s (nicht gezeigt, $\tau_{\text{Erk}, -60\text{mV}}$ für Konstrukte in Tabelle A.2 zusammengefasst).

4.3.3 Mutationsstudien an der Kanalrhodopsinchimäre C1V1-25

Hohe Photoströme und die rotverschobene Absorption machen C1V1 zu einem guten Ausgangskonstrukt, um durch Austausch einzelner Aminosäuren Eigenschaften wie Kinetik und Absorption zu untersuchen und zu verändern. Hierbei wurden zum Teil verschiedene aus der Literatur bekannte Mutationen in C1V1 eingeführt. Durch Austauschen einzelner Helices (siehe Abschnitt 4.3.1) konnten auch einzelne Sequenzabschnitte bestimmt werden, in denen entscheidende Aminosäuren für die Absorption liegen. Durch zusätzliche Sequenzvergleiche mit längerwelligen Typ-I Rhodopsinen (C1, C2, V1, V2, BR, SRII, HR siehe Sequenzvergleich in Anhang Abbildung A.2) konnten einzelne möglicherweise für die Absorption relevante Positionen

aufgefunden werden.

Farbverschiebung an C1V1

Mutante	λ_{max} (nm)	J (pA · pF ⁻¹)	τ_{Abk} (ms)	$\tau_{Abk,ima}$ (ms)
C1V1-25	539 ± 4	61 ± 10	130 ± 17	70 ± 3
*C1V1 E87Q	539±1	38±8	103±25	/
*C1V1 W120A	~ 540	≤3	/	/
*C1V1 E121T	538±2	36±7	113±36	/
*C1V1 E122T	547±2	83±12	157±24	73±4
C1V1 E122Q	545±1	21±10	368±67	/
C1V1 E122S	536±1	43±11	84±16	/
*C1V1 E122D	/	/	/	/
C1V1 Y160T	538±2	5±4	70±26	/
C1V1 W163F	537±1	10±4	107±12	/
*C1V1 L165F	~543	≤3	/	/
*C1V1 W201T	540±1	28±8	56±9	/
*C1V1 S220G	526±1	61±8	122±14	17±1
*C1V1 L221T	546±1	24±12	89±9	/
C1V1 L221D	/	/	/	/
C1V1 L221S	/	/	/	/
C1V1 S222C	/	/	/	/
*C1V1 G263S	540±1	44±9	96±28	/
*C1V1 A295S	521±1	53±10	101±25	/
C1V1 N297V	~525	≤ 3	/	/

Tabelle 4.2: Die Tabelle zeigt Mutationen in C1V1, die eingeführt worden sind um die Absorption zu verändern. In der 1. Spalte sind die Absorptionsmaxima angegeben. Spalte 2 gibt den Mittelwert der Stromdichten wieder. Die Abklingkinetik wurde mittels Dauerlichtexperiment bestimmt und ist in der 3. Spalte gezeigt. Für einige Mutanten wurden Laserexperimente in Oozyten durchgeführt, um die immanente Abklingkinetik zu bestimmen (4. Spalte). (* Konzeption und molekulargenetische Realisierung M.Prigge. Elektrophysiologische Charakterisierung F.Schneider und M.Prigge.)

In Abbildung 4.14 werden die Positionen der mutierten Aminosäuren an einer modellierten C1V1 Struktur gezeigt. Informationen zur Absorption, Photostromamplitude und Abklingkinetik sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst.

Die Mutation E87Q liegt laut der Helixverteilung von Zhang *et al.* [136] am Anfang von Helix A. Die analoge Mutation in C1 verhindert H^+ -abhängiges Verschieben

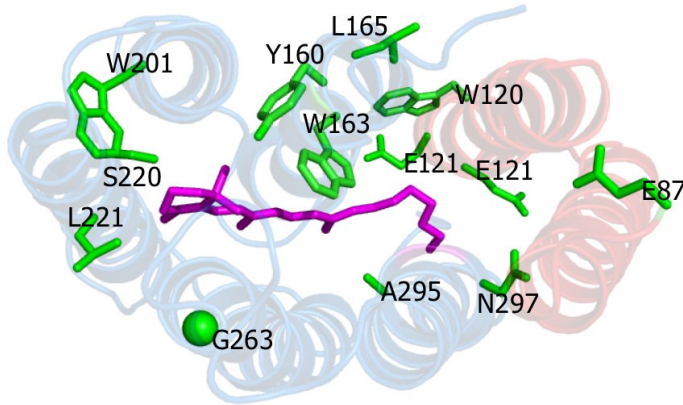


Abbildung 4.14: Illustriert die Positionen der einzelnen mutierten Aminosäuren in einem auf BR (1KGB.pdb) basierten C1V1 Modell, die hinsichtlich des Verschiebens von λ_{max} ausgewählt wurden. Im Bezug zu C2 ist die Bezeichnung der Positionen um 39 Aminosäuren weiter verschoben. Für Details siehe Sequenzvergleich Abbildung A.2 und Tabelle 4.2.

des Absorptionsmaximums von 470 auf 500 nm bei einem Wechsel des pH-Wertes von pH 7.5 auf 4.0 [46]. Diese Mutation in C1V1 hatte keinen Einfluss auf die untersuchten Parameter. Auch konnte die charakteristische Blauverschiebung im C1V1 bei geringen H^+ Konzentrationen durch diese Mutation nicht beeinflusst werden. Weitere Mutationen, die keinen Einfluss auf die Absorptionseigenschaften der Chimäre hatten, sind W120A, Y160T, W163F, L165F, W201T und G263S (siehe Tabelle 4.2). Bemerkenswert war, dass trotz der starken sterischen Veränderungen bei Mutationen wie beispielsweise W120A, Y160T oder auch L165F immer noch eine Aktivität nachgewiesen werden konnte. Diese Mutationen besaßen kleine Photostromamplituden wie aus den geringen Stromdichte aus Tabelle 4.2 gezeigt.

Die beiden Positionen E121 und E122 liegen vermutlich im Beginn von Helix B und sind somit zytoplasmatisch lokalisiert. Der Austausch E121T führt bei den untersuchten Merkmalen zu keinen nennenswerten Veränderungen. Dagegen hat die Position E122 einen Einfluss auf die Absorption. An dieser Stelle wurden folgende Mutationen eingeführt: E122T, E122Q, E122S und E122D. Im Gegensatz zu den anderen Mutationen geht der Austausch E122D mit einer deutlichen Verkleinerung des Van der Waals Volumens um $\sim 20 \text{ \AA}^3$ einher und könnte ursächlich für den Funktionsverlust dieser Mutante sein. Dagegen besitzt die Mutation E122T eine rotverschobenes λ_{max} von $547 \pm 2 \text{ nm}$. Hierbei scheint sich die Abklingkinetik im Dauerlichtexperiment für E122T mit $157 \pm 24 \text{ ms}$ im Vergleich zu C1V1 kaum zu verändern ($130 \pm 17 \text{ ms}$). Auch

die immanenten Abklingkinetiken zeigen keinen signifikanten Unterschied. Des Weiteren besitzt diese Mutation eine hohe Stromdichte von $83 \text{ pA} \cdot \text{pF}^{-1}$ (siehe Tabelle 4.2). Die Mutation E122S besitzt keinen Einfluss auf die Abklingkinetik und bedingt eine moderate Stromdichte von 43 ± 11 . Die λ_{max} liegt bei 536 nm und ist somit im Vergleich zum C1V1 um 3 nm blau verschoben. E122Q besitzt auch ein leicht rotverschobenes Absorptionsmaximum von 545 nm . Überraschenderweise verlangsamt diese Mutation die Abklingkinetik um \sim das 4 fache auf 368 ms .

Mutationen an den Positionen L221 und S220 in Helix E beeinflussten auch die Absorptionseigenschaften von C1V1. Nach dem Strukturmodell liegt das Leucin in der Nähe des β -Iononringes. L221 ist in Abbildung 4.14 leicht vom Retinal abgewandt (Homologiemodell). Das L221 wurde gegen die polaren As Thr, Ser und Asp ausgetauscht. Die beiden Mutationen L221S und L221D sind nicht aktiv. Lediglich die Mutation L221T besitzt eine Photostromdichte ($24 \text{ pA} \cdot \text{pF}^{-1}$) und ein um 6 nm verschobenes Absorptionsmaximum auf $\lambda_{max}=545 \pm 1 \text{ nm}$. Auch diese Mutation hat wie E122T keinen Einfluss auf die Abklingkinetik (siehe Tabelle 4.2).

Die Mutation S220G liegt auch in der Nähe des β -Iononringes und stellt den Austausch einer polaren zu einer unpolaren Aminosäure dar. Durch diese Mutation wurde das λ_{max} auf 526 nm blauverschoben. Dabei zeigte die Mutante eine ähnliche Kinetik und Stromdichte wie C1V1 (siehe Tabelle 4.2).

Die Mutation A295S befindet sich in Helix G und ist direkt verbunden mit der $RSBH^+$ (K296). A295S verursachte ein hypsochromes Verschieben der Absorption um 17 nm auf 521 nm . Stromdichte und Abklingkinetik wurden durch diese Mutation kaum beeinflusst.

An der in C1V1 homologen Position N297 befindet sich in den beiden rotverschobenen Typ I Rhodopsinen BR und SRI ein Val (siehe Sequenzvergleich in Anhang Abbildung A.2). Die entsprechende Mutation im C1V1 führt unerwartet zu einem hypsochromen Verschieben der Absorption auf $\sim 525 \text{ nm}$. Das Absorptionmaximum konnte aber nur unzureichend genau bestimmt werden, weil die Stromdichte von $\leq 3 \text{ pA} \cdot \text{pF}^{-1}$ keine genauere Bestimmung zuließ.

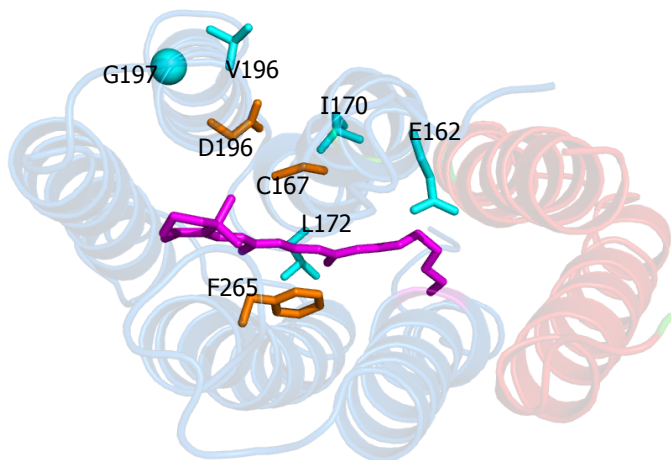


Abbildung 4.15: Illustriert die Positionen der einzelnen mutierten Aminosäuren in einem auf BR (1KGB.pdb) basierten C1V1 Modell, die Einfluss auf die kinetischen Eigenschaften haben sollten. Im Bezug zu C2 ist die Bezeichnung der Position um 39 Aminosäuren weiter verschoben. Die *zyan* gefärbten Aminosäuren sollten τ_{Abk} beschleunigen, wohingegen die *orange* gefärbten Aminosäuren den Photozyklus verlangsamen sollten. Für Details siehe Sequenzvergleich A.2 und Tabellen 4.3 und 4.4.

Veränderung der Kinetik von C1V1-25

Wie in Abschnitt 1.4.1 bereits erwähnt, gibt es einige in der Literatur beschriebene Mutationen, die einen Einfluss auf die Geschwindigkeit des Photozyklus haben [109, 108, 34, 97, 140, 56, 111].

Die homologe Position des angenommenen C2 Gegenions E123 wurde als erstes untersucht. C1V1 E162 wurde gegen Thr beziehungsweise Ala in C1V1 ausgetauscht. Wie für C2 bereits in der Literatur beschrieben, beschleunigt die E123T die Abklingkinetik um das 2 fache und verschiebt das Aktionsspektrum um $\sim 30 \text{ nm}$ bathochrom gegenüber C2 [97]. Auch die Ala Mutation weist ein ähnliches Verhalten auf (beides nicht gezeigt). C1V1 E162T beschleunigt τ_{Abk} um das $\sim 2 - 3$ fache. Im Falle der C1V1 E162T Mutation verändert sich $\tau_{Abk,ima}$ sogar um mehr als das 3 fache auf $21 \pm 1 \text{ ms}$ (Vergleiche Tabellen 4.1 und 4.3). Im Gegensatz zu homologen Mutationen in C2 führten beide Mutationen im C1V1 zu einem hypsochromen Verschieben des Aktionsspektrums auf $525 \pm 2 \text{ nm}$ für E162T und auf $534 \pm 1 \text{ nm}$ für E162A. Beide Mutationen zeigten ein verbreitertes Spektrum und eine moderate Stromdichte (siehe Tabelle 4.3).

Die Mutation C1V1 I172L in Helix C wurde von Lin *et al.* erstmalig in einer C1C2-52 Chimäre eingeführt [58]. Im C1V1 verlangsamte diese Mutation den τ_{Abk} 4 fach (siehe

Mutante	λ_{max} (nm)	J (pA · pF ⁻¹)	τ_{Abk} (ms)	$\tau_{Abk,ima}$ (ms)
C1V1-25	539 ± 4	61 ± 10	130 ± 17	70 ± 3
*C1V1 E162T[97]	525±2	39±12	45±8	21±1
C1V1 E162A[97]	534±1	34±13	51±11	/
C1V1 L170V[58]	540±1	38±11	73±15	/
C1V1 L170I	534±1	46±5	162±13	/
C1V1 I172L	537±1	48±13	263±85	/
*C1V1 V196I/G197A	540±1	33±4	46±19	38±4
*C1V1 C198T	538±4	13±4	43±12	/
*C1V1 C198M	533±3	8±5	31±21	/

Tabelle 4.3: Zeigt verschiedene Mutationen, die zum Beschleunigen der Abklingkinetik in C1V1 eingeführt wurden. Für interessante Mutationen ist in der letzten Spalte auch die immanente Abklingkinetik gezeigt. Die Referenzen beziehen sich auf Publikationen in denen homologe Mutationen in C2 [97] beziehungsweise in einer C1C2-52 Chimäre [58] untersucht wurden. (* Konzeption und molekulargenetische Realisierung M.Prigge. Elektrophysiologische Charakterisierung F.Schneider und M.Prigge.)

Tabelle 4.3).

Auch in der sehr nah gelegenen Position C1V1 L170 führte das Einbringen eines Ile überraschend zum Erhöhen von τ_{Abk} auf 163 ms. Dagegen zeigte die entsprechende Val Mutation im Dauerlichtexperiment eine ~ 2 fache beschleunigte Abklingkinetik. Des Weiteren verschob die Mutation L170I den λ_{max} um 6 nm zu kürzeren Wellenlängen. Die Doppelmutation V196I/G197A liegt in der Helix D und entspricht homologen Aminosäuren in HR. Die Abklingkinetik beschleunigte sich 2 fach und auch im Laserexperiment konnte ein beschleunigter immanenter $\tau_{Abk,ima}$ von 38 ms bestimmt werden. Die beiden Einzelmutationen, V196I und G197A, besaßen jeweils einen τ_{Abk} von 123±24 und 79±19 ms (nicht in der Tabelle 4.3 aufgelistet). Die Mutationen hatten keinen Einfluss auf das Absorptionsmaximum.

Die Position C1V1 C198 beziehungsweise die bereits charakterisierte und veröffentlichte C2 T159C Mutation besitzt einen großen Einfluss auf die Photostromamplitude und Kinetik [52]. Die Mutation C2 T159C vergrößerte den Photostrom in HEK293 Zellen um den Faktor 6 (nicht gezeigt). Gleichzeitig verlangsamte sich der Photozyklus auf τ_{Abk} 45±7 ms. Im V1 entsprechend auch im C1V1 befindet sich bereits ein Cys an dieser

Position. Den Vermutungen entsprechend führte die Mutation C198T im C1V1 zu einem Beschleunigen des Photozykluses auf 43 ± 12 ms und zum Verringern des Photostroms um den Faktor 5 (siehe Stromdichte in Tabelle 4.3). Die zu BR homologe Mutation C1V1 C198M besaß eine sehr geringe Photostromdichte ($J = 8 \pm 5$ pA · pF⁻¹) und einen beschleunigten Photozyklus (siehe Tabelle 4.3).

Mutante	λ_{max} (nm)	J (pA · pF ⁻¹)	τ_{Abk} (s)	$\tau_{Abk,ima}$ (s)
C1V1-25	539 ± 4	61 ± 10	130 ± 17	70 ± 3
C1V1 C167T[108]	540 ± 3	13 ± 5	1.3 ± 0.8	/
C1V1 C167S[108]	537 ± 4	21 ± 7	4.4 ± 2.2	/
C1V1 D195A[109]	/	/	/	/
C1V1 D195N	542 ± 4	5 ± 3	0.086 ± 0.043	/
C1V1 F265Y	511 ± 2	20 ± 5	0.46 ± 0.054	/

Tabelle 4.4: Zeigt verschiedene Mutationen, die zum Verlangsamen der Abklingkinetik in C1V1 eingeführt wurden. Die Referenzen beziehen sich auf Publikationen mit entsprechenden homologen Mutationen in C2. Der τ_{Abk} und $\tau_{Abk,ima}$ sind in Sekunden angegeben!

Die sogenannten SFR Mutanten zeichnen sich durch einen 100 – 10000 x länger andauernden Photozyklus im Vergleich zu C2 aus [108, 109]. Analoge Mutationen zu Thr und Ser an der im C1V1 homologen Position C167, verlangsamten den Photozyklus, dies aber lediglich um den Faktor 14 beziehungsweise 48 im Vergleich zum ursprünglichen C1V1 (Vergleiche 4.1 und 4.4). Auch wenn berücksichtigt wird, dass C1V1 6 x langsamer war als C2, war der Einfluss dieser Mutationen im C1V1 deutlich geringer. Die Absorptionseigenschaften veränderten sich dabei nicht. Wie auch im C2 führten die Mutationen zu einer geringeren Photostromamplitude (siehe Tabelle 4.4).

Weitere Mutationen, die den Photozyklus im C2 um das mehr als 12000 fache verlangsamten, sind D156A und D156N (siehe Abschnitt 1.4.1). Die homologe Mutation D195A war in C1V1 nicht funktionell. Die Mutation C1V1 D195N war zwar funktionell, besaß aber eine Stromdichte von nur 5 ± 3 pA · pF⁻¹. Interessanterweise veränderte sich die Abklingkinetik von C1V1 D195N nicht signifikant zu derjenigen von C1V1 (Vergleiche 4.1 und 4.4) wobei der Standardfehler aufgrund der kleinen Photostromamplitude 50 % beträgt.

Die Mutation F221Y in V1 verschob das Aktionsspektrum auf $\sim 510\text{ nm}$ und verbreiterte das Spektrum halbmaximal um $\sim 50\text{ nm}$ auf mehr als 150 nm . Des Weiteren führt diese Mutation im V1 zum Verlangsamen von τ_{Abk} um den Faktor 5 (nicht gezeigt, siehe F. Schneider [139]). Die homologe Mutation F265Y in C1V1 verschiebt das Aktionsspektrum um 29 nm hypsochrom. Die Abklingkinetik verlangsamte sich dabei ungefähr um den Faktor 4.

Veränderung der Kalziumleitfähigkeit von C1V1-25

In Helix C bewirkt die Mutation L132C in C2 die Zunahme des Photostroms und eine 1.6 fache Erhöhung der Kalziumpermeabilität [141]. Diese Erhöhung ging mit einer verbesserten Membranständigkeit und 2 x höheren Öffnungsdauer einher. Untersuchungen am konfokalen Mikroskop für die homologe Mutation im C1V1 (L171C) wiesen starke fluoreszierende Aggregate im Zytoplasma und eine schlechte Membranständigkeit auf (nicht gezeigt). Bei Patch-Clamp Untersuchungen waren die Photostromamplituden auch verringert ($J=9\pm4\text{ pA} \cdot \text{pF}^{-1}$). Auch die sehr ähnliche Mutation L171S besitzt eine geringe Stromdichte wie die Cysteinmutation (siehe Tabelle 4.5).

Da der in ChR geleitete Anteil an Ca^{2+} erst bei hohen, unphysiologischen $[\text{Ca}^{2+}]$ und bei geringer $[\text{H}^+]_e$ mittels Patch-Clamp gemessen werden kann (siehe Abbildungen Balkendiagramme 4.5 C und 4.7 C), kann die Ca^{2+} Leitfähigkeit im Fura-2 Experiment bei pH Wert 7.2 getestet werden. Da im Fura-2 Experiment die Fluoreszenzdifferenz vor und nach Belichtung auch abhängig ist von der Anzahl der aktivierbaren ChRs, muss zum Abschätzen der Kalziumpermeabilität auch die Stromdichte des entsprechenden Konstrukts berücksichtigt werden.

Die Konstrukte C1V1 und C2 zeigten nach einer 10 s Belichtung mit 560 beziehungsweise 450 nm einen $3 - 4\%$ Anstieg des Fura-2 Signales (siehe Abbildung 4.16). Untransfizierte HEK Zellen zeigten dagegen keine wesentliche Abweichung von der Basislinie. Als Positivkontrolle diente die C2 L132C für die bereits eine erhöhte Ca^{2+} -Permeabilität beschrieben wurde. Für diese Mutante lag der Anstieg bei $\sim 11 - 13\%$ des

Mutante	λ_{max} (nm)	J (pA · pF ⁻¹)	τ_{Abk} (ms)	$\tau_{Abk,ima}$ (ms)
C1V1-25	539 ± 4	61 ± 10	130 ± 17	70 ± 3
*C2 T159C[52]	463±2	83±19	62±2	27±1
**C2 L132C[141]	461±1	76±16*	68±18	30±2
**C2 L132C/T159C	460±3	96±22*	244±30	109±15
C1V1 L171C	536±2	9±4	102±45	/
C1V1 L171S	541±1	12±7	167±65	/

Tabelle 4.5: Listet Mutanten im C1V1 auf in den die Ca^{2+} -Leitfähigkeit untersucht wurde. Als Vergleich wurde die C2 L132C Mutation mit einer bereits beschriebenen erhöhten Ca^{2+} -Leitfähigkeit aufgelistet, sowie auch die C2 T159C als eine Mutation mit ähnlich hohen Photostromamplituden wie C2 L132C. (* Bei einer angenommenen durchschnittlichen Membrankapazität von 30 pF · Zelle⁻¹).

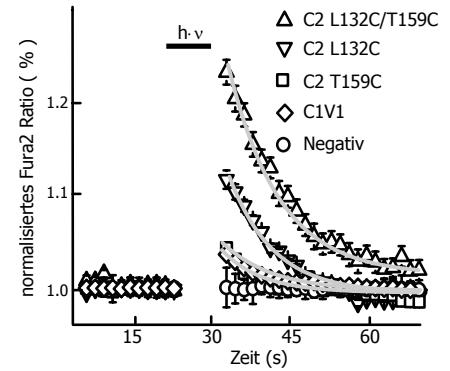
(* Molekulargenetische Realisierung S.Greulich. Elektrophysiologische Charakterisierung F.Schneider und M.Prigge.

** Molekulargenetische Realisierung M.Prigge. Elektrophysiologische Charakterisierung F.Schneider und M.Prigge.)

Fluoreszenzsignales. Die homologen Mutationen C1V1 L171C und C1V1 L171S konnten im Fura-2-Experiment nicht vermessen werden, da Zellen nach der Transfektion mit diesen beiden Konstrukten bereits eine unphysiologische Morphologie aufwiesen und sich beim Beladen mit Fura-2 endgültig vom Deckglas ablösten (nicht gezeigt).

Um zu testen ob die Kombination von C2 L132C/T159C auch ein ähnliche schlechte Expression aufweist wie die entsprechende C1V1 L171C, die ja bereits auf der homologen Position 198 ein Cystein besitzt, wurden Patch-Clamp Untersuchungen an dieser Doppelmutante durchgeführt. Überraschenderweise besaß diese Kombination ein sehr große Photostromamplituden (siehe Tabelle 4.5) und die Inaktivierung verringert sich auf $\sim 3\%$ (nicht gezeigt / siehe Tabelle A.2). Auch im Fura-2 Experiment wies diese Mutation die größte Fluoreszenzsignaldifferenz auf. Da sich in C2 T159C keine erhöhte Ca^{2+} -Leitfähigkeit beobachten ließ, wird das große Fluoreszenzsignal der Doppelmutante zum Teil auf eine höhere Expression beziehungsweise Membranständigkeit zurückgeführt (Vergleiche Stromdichten in Tabelle 4.5). Da im Fura-2 Experiment die Belichtungsdauer 10 s betrug, muss auch Inaktivierung der Mutanten berücksichtigt werden (siehe Tabelle Appendix A.2. Insbesondere bei Vergleich der Mutanten C2 T159C (Iak: 60 %) mit C2

Abbildung 4.16: Stellt die unterschiedlichen Kalziumpermeabilitäten für verschiedene C2- und C1V1 Mutanten dar. Die Aufnahme des Fura-2 Signals mit 340 und 380 nm erfolgte jeweils mit 0.3 Hz für 500 ms bei einer Lichtintensität von $0.5 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$. Während der Aktivierung der ChRs für 10 s mit 450 bzw. 560 nm Licht (80 bzw. 17 $\text{mW} \cdot \text{cm}^{-2}$) konnte kein Fura-2 Signal aufgenommen werden *schwarzer Balken*). Der Datensatz für ein Konstrukt setzt sich aus mindestens 20 Zellen zusammen.



T159C/L132C (Iak 3 %) und C1V1 (Iak 35 %) ist die Inaktivierung von entscheidender Bedeutung.

Verbindung von spektralen und kinetischen Mutationen In diesem Abschnitt wird beschrieben, wie verschiedene Mutationen aus den vorherigen Untersuchungen miteinander kombiniert wurden. Im Allgemeinen werden Mutanten mit veränderter Absorption mit jenen kombiniert, die eine veränderte Kinetik aufweisen. Dies sollte zu ChR-Varianten führen, die dann maßgeschneiderten, je nach optogenetischen Anwendung, benutzt werden können.

Die Doppelmutante V196I/G197A besaß einen beschleunigten Photozyklus. Die Eigenschaften der Kombination mit den beiden bathochrom verschobenen Mutationen E122T und L221T sind in der Tabelle 4.6 zusammengestellt. Beide Mutationen besaßen weiterhin eine rotverschobene Absorption und auch einen schnelleren Photozyklus ($45 \pm 13 \text{ ms}$ V196I/G197A/L221T und $62 \pm 12 \text{ ms}$ für E122T/V196I/G197A). Die Stromdichte für die L221T Mutantenkombination lag bei $23 \pm 7 \text{ pA} \cdot \text{pF}^{-1}$ und somit im Bereich von der L221T Einzelmutation und war 3 x kleiner als beim ursprünglichen C1V1 (siehe Tabelle 4.2. Das synergistische Zusammenspiel beider Mutationen wurde auch durch die immanente Abklingkinetik für E122T/V196I/G197A mit einem $\tau_{\text{Abk,ima}}$ von $19 \pm 2 \text{ ms}$ bestärkt. Die Stromdichte von $68 \pm 17 \text{ pA} \cdot \text{pF}^{-1}$ war höher als die vom ursprünglichen C1V1 (Vergleich Tabelle 4.1 und 4.6).

Die zweite Kombination von Geschwindigkeits- und Farbmутanten ergab C1V1 E122T/E162T. Sie zeichnete sich durch eine maximale Absorption bei $528 \pm 2 \text{ nm}$ aus

und war damit nicht signifikant rotverschoben im Vergleich zu der Einzelmutation C1V1 E162T ($\lambda_{max} = 525 \pm 2 \text{ nm}$). Trotz des ungefähr gleichen λ_{max} wies das Aktionsspektrum der Doppelmutante kein hypsochromes verbreitertes Spektrum auf. Der τ_{Abk} war mit 43 *ms* im Pulsexperiment nicht signifikant schneller als die Einzelmutation C1V1 E162T. Dagegen konnte im Laserexperiment eine Beschleunigung von 21 *ms* für E162T auf 15 *ms* für E122T/E162T festgestellt werden (Vergleiche Tabellen 4.2 und 4.6). Die Photostromdichte lag für die Doppelmutation bei $54 \pm 14 \text{ pA} \cdot \text{pF}^{-1}$.

Weiterhin wurde getestet, ob sich durch Kombination der jeweiligen Geschwindigkeitsmutanten der Photozyklus noch weiter beschleunigen lässt. Bei der Kombination E162T/V196I/G197A summierten sich die kinetischen Effekte aller drei Mutationen zu einem $\tau_{Abk,ima}$ von 9 *ms*. Die maximale Absorption lag bei 530 *nm* und war somit nahezu identisch mit der der Einzelmutation C1V1 E162T (Vergleiche Tabellen 4.3 und 4.6). Die Stromdichte war jedoch 3 x kleiner als die des ursprünglichen C1V1.

Die nächste Geschwindigkeitskombination C1V1 V196I/G197A/C198T konnte kinetisch nicht untersucht werden, da der Photostrom zu klein war, um ausreichend genaue Messungen zu erhalten ($J \leq 3$). Die dritte Geschwindigkeitskombination, nämlich C1V1 E162T/C198T, besaß im Dauerlichtexperiment eine Abklingkinetik von $19 \pm 11 \text{ ms}$. Trotz der schlechten Stromdichte für die Einzelmutation C198T besaß die Doppelmutante eine moderate Stromdichte von $51 \pm 21 \text{ pA} \cdot \text{pF}^{-1}$.

Zum Verbessern der Absorptionseigenschaften wurden auch die beiden rotverschobenen Farbmутanten miteinander kombiniert. Die Doppelmutante C1V1 E122T/L221T besaß einen λ_{max} von $541 \pm 4 \text{ nm}$ und war somit nicht weiter rotverschoben. Im Vergleich zu den Einzelmutanten war die maximale Absorption sogar leicht hypsochrom verschoben. Einschränkend sei aber hinzugefügt, dass ein zu kleiner Photostrom ($J = 4 \pm 2 \text{ pA} \cdot \text{pF}^{-1}$) ein genaues Bestimmen von λ_{max} erschwert. Die Kombination der beiden hypsochrom verschobenen Mutanten S220G und A295S wirkte synergistisch auf ein λ_{max} von 516 *nm*. Das $\Delta\lambda_{max}(C1V1 - S220G/A295S)$ betrug somit 23 *nm*. Auch hier verhielten sich die jeweilige Blauverschiebung beider Einzelmutationen nicht additiv

($\Delta\lambda_{max}(C1V1 - S220G)$ von 13 nm beziehungsweise $\Delta\lambda_{max}(C1V1 - A295S)$ von 18 nm, Vergleiche Tabellen 4.1, 4.14 und 4.6).

Die Ergebnisse der Kombinationen von C167S, der langsamsten C1V1 Mutante, mit den beiden Farbmутanten E122T und S220G sind in Tabelle 4.6 aufgeführt. Beide Mutanten zeigten eine 40 – 50 x verlangsamte Abklingkinetik und ein entsprechend verschobenes Absorptionsmaximum (siehe Tabelle 4.6). Die Stromdichten für die C1V1 basierten SFRs sind $\leq 20 \text{ pA} \cdot \text{pF}^{-1}$.

Um die unterschiedlichen Auswirkungen der gleichen Mutationen in C2 (C128 Position) und C1V1 (C167 Position) zu verstehen, wurden weitere zusätzliche Mutationen untersucht (siehe Tabelle 4.6). Als neben der SFR Mutation C167S auch die Mutation C198T eingeführt wurde, verlangsamte sich der τ_{Abk} noch einmal um den Faktor ~ 2 . Wie bereits erwähnt, besaß C2 *wt* an der homologen Position 159 bereits ein Thr. Bei Austausch dieses Thr gegen ein Cys auf der SFR Mutante C2 C128S beschleunigte sich der τ_{Abk} auf 4 s und war somit 30 x schneller als bei der Einzelmутation C2 C128S (siehe Tabelle 4.6)[108].

Mutante	λ_{max} (nm)	J (pA · pF ⁻¹)	τ_{Abk} (ms)	$\tau_{Abk,ima}$ (ms)
C1V1-25	539 ± 4	61 ± 10	130 ± 17	70 ± 3
*C1V1 E122T/V196I/G197A	544±1	68±17	62±3	41±3
C1V1 V196I/G197A/L221T	543±1	23±7	45±13	/
*C1V1 E122T/E162T	528±2	54±14	42±1	15±1
C1V1 E162T/V196I/G197A	530±1	26±7	20±9	8±1
C1V1 V196I/G197A/C198T	~ 538	≤ 3	/	/
C1V1 E162T/C198T	530±2	51±21	19±11	9±4
*C1V1 E122T/L221T	541±4	4±2	105±21	/
C1V1 S220G/A295S	516±1	51±17	86±21	/
*C1V1 C167S/S220G	528±4	14±5	4683± 1165	6670±3500
*C1V1 E122T/C167S	537±5	20±6	4236± 1779	5800±2600
C1V1 C167S/C198T	538±6	15±6	9100± 2100	/
C2 C128S/T159C	472±6	8±5	4000± 1400	/

Tabelle 4.6: Zusammenfassung einiger Parameter von verschiedenen Mutantenkombinationen. Es wurden in der Regel Mutanten aus den vorherigen Untersuchungen miteinander kombiniert, um die Kinetik zu beschleunigen beziehungsweise sie zu verlangsamen und die Absorption stärker blau beziehungsweise rot zu verschieben. Die Mutanten wurden je nach Absorptionsmaximum bei 560, 520, 490 oder 460 nm angeregt. Für einige schnelle Varianten wurde auch die immanente Abklingkinetik bestimmt.

(* Konzeption und molekulargenetische Realisierung M.Prigge. Elektrophysiologische Charakterisierung F.Schneider und M.Prigge.)

4.4 Kanalrhodopsine in Kombination mit Kalziumsensoren

4.4.1 Zeitaufgelösten Fluoreszenzmessung von Kanalrhodopsin mit Fura-2

Durch die größere farbliche Flexibilität mit den neuen rotverschobenen C1V1 Varianten wurden Versuche unternommen, ChRs mit synthetischen oder genetischen Sensoren zu kombinieren, um auch die zelluläre Antworten optisch auslesen zu können. Um eine Koaktivierung von Kalziumsensor und ChR zu vermeiden, müsste ein Kalziumsensor benutzt werden, der bei längeren Wellenlängen als denen der ChRs aktiviert wird. Solche rotverschobenen Kalziumsensoren wie Crimson und X-rhod wurden in mTrek Zellen nur schlecht aufgenommen und führten zu fluoreszierenden Aggregaten (nicht gezeigt). Fluo4 besitzt einen hohen Extinktionskoeffizienten ($70 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [142]) und eine gute Beladungseffizienz (nicht gezeigt). Durch die λ_{max} von 490 nm überlappte das Fluo4 Spektrum sehr stark mit denen der ChRs. Die UV-nahen Anregung der Absorptionsmaxima von Fura-2 bei 340 (mit Ca^{2+}) und 380 nm (ohne Ca^{2+}) führten bei Lichtintensitäten $\sim 2 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ zu Photostromamplituden $\sim 25 \%$ des maximalen Photostroms. Um die Koaktivierung zu verringern, wurde die Lichtintensität gemindert. Die Fura-2 Emission konnte noch bis zu einer Exzitationslichtleistung von $\sim 0.1 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ ausgewertet werden.

Die Modellzelllinie, in der durch Depolarisierung ein Kalziumkanal $\text{Ca}_V3.2$ transient geöffnet wird und das Membranpotential über einen Kaliumkanal *mTrek* einstellbar ist, wurde von Frau. P. Q. Baretta zur Verfügung gestellt [120]. Beide Kanäle wurden stabil exprimiert.

Um das typische Verhalten von $\text{Ca}_V3.2$ zu kontrollieren, wurden elektrophysiologische Standardprotokolle im VC Modus an den mTrek HEK Zellen durchgeführt (siehe Abbildung A.1) [143]. $\text{Ca}_V3.2$ öffnete nach einem depolarisierenden Spannungspuls transient innerhalb von $\leq 300 \mu\text{s}$ und besaß eine spannungsabhängige Abklingkinetik von $\sim 10 - 150 \text{ ms}$. Der maximale Ca^{2+} -Einstrom erfolgte bei -30 mV (siehe Abbildung A.1 **A** und **B**). Nach dem transienten Öffnen des Kanals ging dieser in einen deaktivierten Zustand über. Durch hyperpolarisierende Membranspannungen $\leq -70 \text{ mV}$ konnte

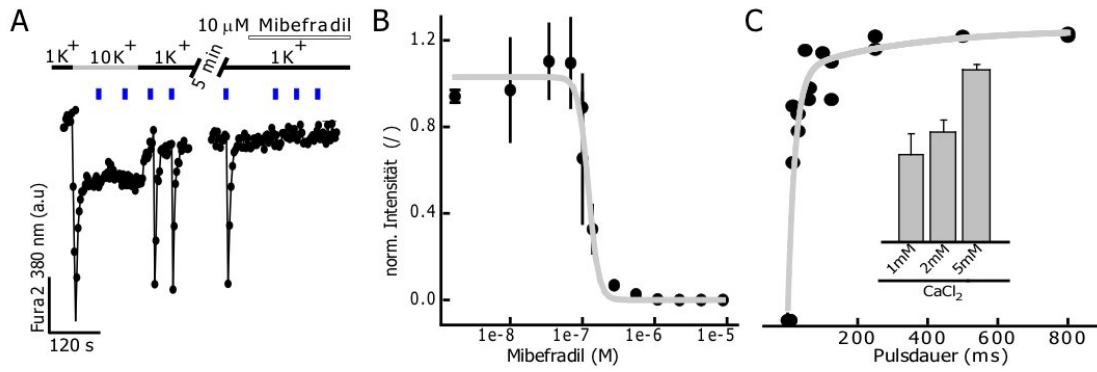


Abbildung 4.17: Experimente zur lichtinduzierten Aktivierung von $Ca_v3.2$ mit gleichzeitiger Detektion des Ca^{2+} Einstroms durch Fura-2 in C2-mCherry transient transfizierten mTrek Zellen. In **A** ist der bei einer Exzitation von 380 nm detektierte Fura-2 Fluoreszenzverlauf bei Stimulation mit 470 nm Pulsen unter Niedrig-KCl (1 mM), Hoch-KCl (10 mM) und Mibefradil (10 μ M) gezeigt. Die Abhängigkeit der blaulichtinduzierten normalisierten Fura-2 Amplitude mit der Mibefradilkonzentration ist in **B** dargestellt. **C** zeigt die Abhängigkeit der Fura-2 Amplitude von der Länge des Blaulichtpulses und der Kalziumkonzentration (*Innenbild*)

$Ca_v3.2$ aus diesem wieder in einen aktivierbaren Zustand zurückgeführt werden.

Um die Funktionalität des *mTrek* Kanals zu testen, wurde die Membranspannung der mTrek Zellen im CC Modus bei verschiedenen extrazellulären K^+ -Konzentrationen gemessen. Im Bereich von 1 – 12 mM KCl war ein direktes, lineares Verhältnis zwischen extrazellulärer K^+ Konzentration und Membranspannung zu erkennen (siehe Abbildung A.1 C).

Mit Fura-2 beladene mTrek Zellen zeigten bei Pufferwechsel von 1 auf 10 mM K^+ einen Ausschlag des Fura-2 Signales für ~ 50 s. Da dieses Verhalten durch den spezifischen T-Typ Kalziumkanal Blocker Mibefradil unterdrückt werden konnte, wurde der Ausschlag der Fura-2 Fluoreszenz als $Ca_v3.2$ vermittelten Ca^{2+} Einstrom interpretiert (siehe Abbildung A.1 D). Ein Einfluss von Mibefradil auf den mTrek Kanal sowie auf C2 konnte nicht festgestellt werden (nicht gezeigt).

Um zu testen, ob durch lichtinduzierte ChR Membrandepolarisation $Ca_v3.2$ geöffnet werden kann, wurde das Konstrukt C2-mCherry in die mTrek Zelllinie transfiziert. Da verhindert werden sollte das bereits beim Abfragen des Fura-2 Signales das C2 ausreichend aktiviert wird um $Ca_v3.2$ zu öffnen, wurde die Fura-2 Anregung auf

$0.5 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ gesenkt. Im Falle solch geringer Lichtintensitäten ist die Fura-2 Fluoreszenzemission bei Anregung mit 340 nm zu gering, so dass sie nicht zur Auswertung herangezogen werden konnte. Somit stand beim Verwenden von C2 nur die 380 nm induzierte Fluoreszenzemission von Fura-2 als Kalziumsignal zur Verfügung. Wie in Abbildung 4.17 **A** dargestellt, bewirkten 100 ms blaue Lichtpulse (460 nm , $\sim 80 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$) ein schnelles Ausschlagen des Fura-2 Signales bei geringen K^+ Konzentrationen. Da auch diese blaulichtinduzierten Fluoreszenzausschläge Mibefradil sensitiv waren, wird die Verringerung der Fluoreszenz als Einstrom von Ca^{2+} durch $\text{Ca}_V3.2$ interpretiert. Durch die Zugabe verschiedener Konzentrationen von Mibefradil konnte ein K_D von 130 nM bestimmt werden (siehe Abbildung 4.17 **B**). Um einen maximalen Ca^{2+} Einstrom zu induzieren, waren Blaulichtpulse mit einer Dauer von $\geq 100 \text{ ms}$ notwendig (siehe Abbildung 4.17 **C**). Bei einer möglichen zu starken Anregung von Fura-2, die zum Öffnen von $\text{Ca}_V3.2$ führen würde, wäre ein Anstieg der Basislinie zu erwarten. Die Basislinie blieb bei den hier verwendeten Lichtintensitäten und Abtastraten von $5 - 0.1 \text{ Hz}$ stabil und entsprach nach Kalibrierung einer zytoplasmatischen Ca^{2+} Konzentration von $\sim 57 \text{ nM}$ (siehe A. Rösler [144]). Mit dem rotverschobenen C1V1 Spektrum konnte die Überlappung mit dem Exzitationsspektrum vom Fura-2 verkleinert werden. Eine Fura-2 Anregung konnte somit bei $1.5 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ (3 x höher als bei C2) durchgeführt werden, ohne dass sich die Basislinie veränderte. Unter diesen Bedingungen war die Fluoreszenzintensität bei 340 nm ausreichend groß, um ein Ratio zwischen 340 und 380 nm zu bilden (siehe Abbildung 4.18 **A**). Die Ratioamplitude des Fura-2 Signals lag bei 0.38 ± 0.19 und entsprach einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration von $180 \pm 110 \text{ nM}$. Die Abklingkinetik lag bei $\sim 18 \text{ s}$ und stellte somit den zeitlichen Verlauf des zelleigenen Regulationsmechanismen zur Kompensation der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration und nicht die intrinsische Kinetik von $\text{Ca}_V3.2$ dar (siehe Abbildung Appendix A.1 **A**.)

Um die Möglichkeit zu testen, $\text{Ca}_V3.2$ in einem Experiment mit blauen und grünen ChRs wellenlängenabhängig zu aktivieren, wurden mTrek Zelllinien separat mit C1V1-eCFP und C2-TC-mCherry transfiziert und anschließend wurden diese Zellen auf einem

Deckglas vereinigt (siehe Abbildung 4.18 **B**). Die gemessenen Fluoreszenzspuren zeigten, dass bei einer ChR Aktivierung von $\sim 80 - 17 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ und einer Fura-2 Anregung bei 380 nm mit $\sim 0.5 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ eine separate Stimulation möglich ist (Abbildung 4.18 **C**). Beim Stimulieren mit 405 nm verringert sich das Fura-2 Signal nur für die mit C2-TC-mCherry transfizierten Zellen. In den Zellen mit C1V1-eCFP (obere Fluoreszenzspur) schwankte die Ca^{2+} Konzentration hierbei nur im Fehlerbereich. Bei einer 450 nm Stimulation zeigten beide Zellpopulationen eine Aktivierung von $\text{Ca}_V3.2$ und bei 560 nm nur die C1V1-eCFP mTrek Zellen.

4.4.2 Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung mit Kanalrhodopsin und genetisch-kodierten Kalziumsensoren

Nach den erfolgreichen Versuchen mit Fura-2 in Kombination mit C2 und den verbesserten Messbedingungen für C1V1 sollten auch Experimente an blauabsorbierenden genetisch-kodierten Kalziumsensoren durchgeführt werden. Hierfür wurden die Kalziumsensoren Cameleon und GCaMP3 mit C1V1 N-Terminal fusioniert.

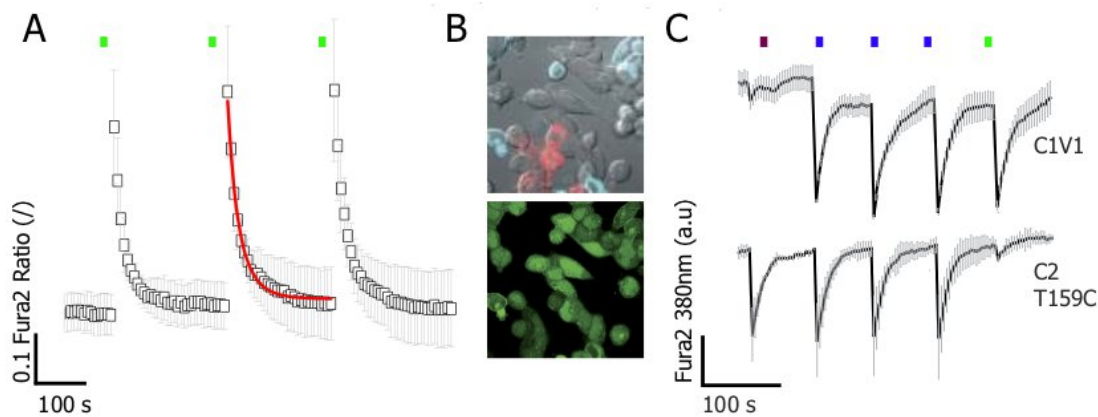


Abbildung 4.18: Fura-2 Messungen in Kombination mit C1V1. **A** zeigt das Fura-2 Ratio aus der Fluoreszenzintensität bei 340 nm und 380 nm Anregung. Das Fura-2 Signal hat eine Abklingkinetik von $\sim 18 \text{ s}$. In **B** sind konfokale Aufnahmen von C1V1-eCFP und C2-T159C-mCherry transfizierten mTrek Zellen (oberes Bild) und die gleichen Zellen bei einer Anregung von 380 nm und einer Fura-2 Emission um 515 nm gezeigt (unteres Bild). Das zeitaufgelöste Fluoreszenzsignal (nur 380 nm) für C1V1 und C2 T159C bei Aktivierungspulsen mit 405 nm (lila), 450 nm (blau) und 560 nm (grün) ist in **C** illustriert.

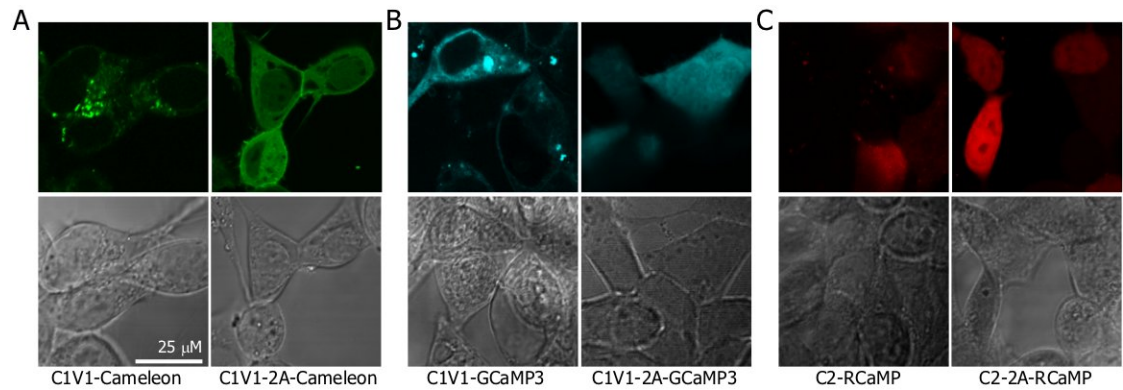


Abbildung 4.19: Repräsentative Fluoreszenz- und Transmissionsbilder der ChR fusionierten Kalziumsensorkonstrukte in HEK Zellen. **A** Cameleon basierte Konstrukte (Exzitation bei 440 nm, Emission bei 515 nm). **B** Fusionskonstrukte von C1V1 mit GCaMP3 und **C** Konstrukte von C2 und RCaMP1.017.

Konfokale Aufnahmen bestätigen erfolgreiche Expression in HEK Zellen (Abbildung 4.19 **A** und **B**). Die beiden Fusionsproteine, in denen der Sensor direkt am C1V1 gebunden wurde, wiesen kleinere fluoreszierende Aggregate auf und besaßen nur eine schwache membranständige Fluoreszenz (Vergleiche Abbildung 4.19 **A** und **B** jeweils links mit 4.11 unten). Die jeweiligen Konstrukten mit dem 2A-Peptid waren dagegen zytoplasmatisch lokalisiert und besaßen eine deutlich stärkere Fluoreszenz (siehe Abbildung 4.19 **A** und **B** jeweils rechts). Die Anzahl der HEK Zellen auf einem Deckglas nach der Transfektion mit den 2A-Peptidkonstrukten war deutlich größer als die der direkt fusionierten Konstrukte. Des Weiteren sieht die Morphologie der Zellen, die die 2A-Peptidkonstrukte exprimieren, vitaler aus, als die mit den fusionierten ChR-Kalziumsensorkonstrukten (nicht gezeigt). Aus der Abbildung 4.19 scheinen die Expressions- und Membraneigenschaften der beiden Konstrukte C2-RCaMP1.017 und C2-2A-RCaMP1.017 (4.19 **C**) ähnlich zu sein wie die Merkmale der äquivalenten C1V1-GCaMP3 beziehungsweise C1V1-Cameleon Konstrukte (siehe Abbildung 4.19 **A** und **B**).

Um die Konstrukte funktionell zu untersuchen, wurden alle Konstrukte in mTreK HEK Zellen transfiziert. In den beiden Cameleon-basierten Konstrukten konnte keine Veränderung des Fluoreszenzsignales (440 nm , $\sim 0.7\text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$) nach Stimulation mit 560 nm bei $12\text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ beobachtet werden. Die Arbeitsgruppe um L.L.

Looger konnte in einer früheren Untersuchung zeigen, dass Cameleon unter gleichen Bedingungen kleinere kalziuminduzierte Fluoreszenzänderungen als GCaMP3 aufweist [84]. Für die Messungen der Cameleon-basierten Konstrukte wurden die Dual- und Tribandfiltersysteme verwendet. Beide Filter waren nicht optimal, um CFP und YFP als FRET Kombination zu messen, da Donor- und Akzeptoremission gleichzeitig auf der CCD Kamera integriert wurden und sich dadurch teilweise gegenseitig kompensierten. Auch bei höheren Ca^{2+} Konzentrationen von 5 und 10 mM konnte kein Signal detektiert werden.

Wie in Abbildung 4.20 **A** zu erkennen ist, konnte durch die Überlappung der Spektren bei C1V1 / GCaMP3 Konstrukten der Kalziumsensor nur mit geringer Intensität angeregt werden. Die GCaMP Fusionsproteine zeigten aber unter gleichen Belichtungsverhältnissen wie die Cameleonmessung eine durch 560 nm induzierte $\sim 4 - 5$ % Fluoreszenzänderung bei einer Ca^{2+} Konzentration von 5 mM (siehe Abbildung 4.20 **B** oben). Bei Konzentrationen von 2 mM waren nur sehr kleine und schwer reproduzierbare Fluoreszenzspitzen zu erkennen (nicht gezeigt). Die Fluoreszenzänderungen stiegen auf $\sim 7 - 9$ % bei 10 mM Ca^{2+} . Die Fluoreszenzspitzen konnten bis auf eine kleine Restaktivität durch 100 μM Mibefradil unterbunden werden. Da die Spektren von C2 und RCaMP1.017 nur minimal überlappten und beide Proteine unabhängig voneinander angeregt werden konnten, konnte RCaMP1.017 bei hoher Lichtintensität von 20 $mW \cdot cm^{-2}$ mit 560 nm abgefragt werden. In der Abbildung 4.20 **C** oben sind die zeitaufgelösten Fluoreszenzsignale vom C2-RCaMP Konstrukt dargestellt. Die normalisierten Fluoreszenzänderungen lagen bei $\sim 7 - 9$ % bei einer Ca^{2+} Konzentration von 2 mM . Die Änderung war abhängig von Ca^{2+} und Mibefradil.

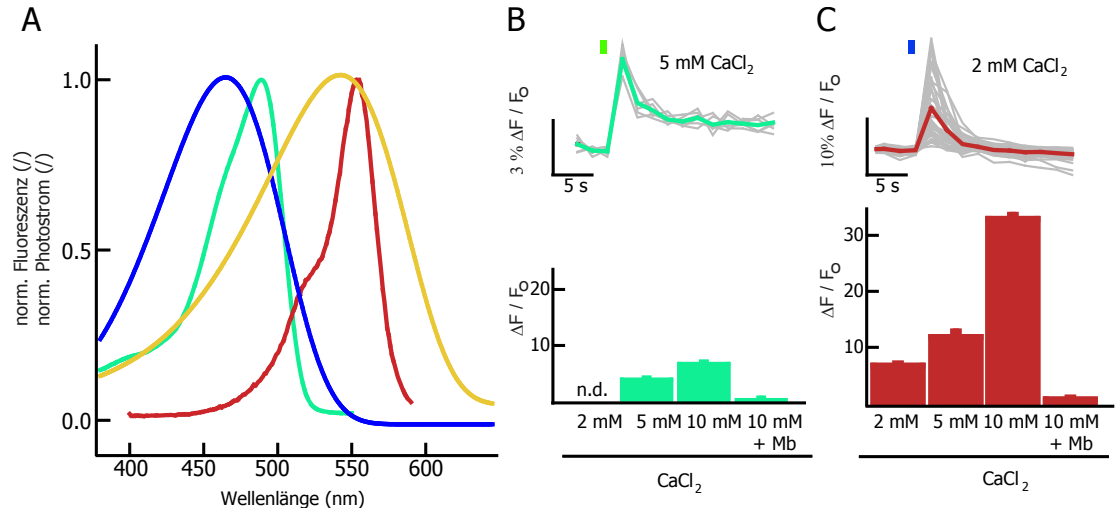


Abbildung 4.20: Verhalten der monomeren Kalziumsensoren GCaMP3 und RCaMP1.017 in mTreK Zelllinien. **A** illustriert die verschiedenen Spektren von Stimulatoren (C2 in *blau* und C1V1 in *gelb*) und Sensoren (GCaMP3 in *hellgrün* und Spektrum von mCherry was exemplarisch für die Absorption von RCaMP1.017 steht *rot*). Es wurden jeweils C2 mit RCaMP1.017 und C1V1 mit GCaMP3 fusioniert. In **B** (*oben*) ist das zeitaufgelöste Fluoreszenzsignal von C1V1-GCaMP3 transfizierten mTrek Zellen gezeigt. Die *grau* unterlegten Spuren sind jeweils die einzeln gemessenen Zellen. Die *grüne* Spur repräsentiert den Mittelwert. Das *Untere* Balkendiagramm demonstriert, inwieweit die Fluoreszenzamplitude Ca^{2+} abhängig ist. Mb bedeutet Zugabe von 100 μM Mibefradil. **C** stellt die gleichen Experimente aus B für die Fusion C2-RCaMP dar. Zu Beachten ist die unterschiedliche Skalierung in den jeweiligen Fluoreszenzspuren. Für die einzelnen Bedingungen wurden zwischen 2 – 30 Zellen ausgewertet.

5 Diskussion

5.1 Messungen an *Chlamydomonas reinhardtii*

Photostrommessungen mittels Saugelektroden an *C. reinhardtii* mit einer Anstiegskinetik von $\leq 200 \mu s$ waren der erste indirekte Beweis einer notwendigen sehr engen Kopplung von Kanal- und Rhodopsindomänen [53, 54]. Vertebraten Rhodopsine besitzen dagegen eine um 2 Größenordnungen langsamere Anstiegskinetik. Die präsentierten Messungen in Abbildung 4.1 haben im Mittel einen P-Strom von $\sim 6 pA$. Die Amplitude und Richtung des Photostromes ist abhängig von der Position des Augenflekes zur Pipette, der Größe der eingesogenen Membranfläche und des Abdichtungswiderstandes zwischen Pipette und Membran und der Lichtintensität. Unter den in Abbildung 4.1 **A** verwendeten, schwachen Belichtungsbedingungen wird kein Flagellenstrom (F-Strom) ausgelöst ($LED \sim 12 mW \cdot cm^{-2}$) [134]. Bei Belichtungspulsen von $300 ms$ ist ein überlagerter Anteil des F-Stromes zu erkennen (Abbildung 4.1 **B**) und der P-Strom zerfällt in den frühen, transienten Photostrom (I_P) und in einen späten, stationären Gleichgewichtsphotostrom (I_{SS}). In *C.reinhardtii* sind die P-Ströme in CW2 Gameten größtenteils auf C1 zurückzuführen [121, 133]. Da nur in der Messkonfiguration mit eingesaugtem Augenfleck direkte einwärtsgerichtete Ladungstransporte gemessen werden können, musste für Untersuchungen der Ionenselektivität die Pipettenlösung verändert und somit für jede Pufferbedingung eine neue Zelle gemessen werden [54]. Die statistische Analyse in 4.1 **C** weist eine 4 x stärkere Zunahme des I_{SS} im Vergleich zu I_P bei Wechsel des pH_p -Wertes von 6.8 zu 4.0 auf. Bereits 2002 diskutierten Ehlenbeck *et al.* ein sequentielles Verändern der Ionenselektivität bei längeren Belichtungspulsen in der Grünalge [145]. Für C1 wurden damals zwei Möglichkeiten in Erwägung gezogen,

nämlich ein Rhodopsin mit zwei verzweigten oder zwei sequentiell hintereinander geschaltete leitenden Zuständen. Die in dieser Arbeit neu präsentierte unterschiedliche Vergrößerung der Photostromamplituden für I_P und I_{SS} bei saurem pH-Wert bestärkt die Hypothese einer lichtadaptierenden Ionenselektivität innerhalb eines ChRs. Solche Phänomene können im Detail mittels Saugelektroden in *C.reinhardtii* nicht untersucht werden, da diese Methode zum einen keine Kontrolle der Membranspannung und zum anderen eine beschränkte ionale Zusammensetzung von intrazellulären und extrazellulären Puffern erlaubt. Ein weiterer Nachteil ist das Fehlen von CW2 Knock-out-Stämmen, in denen C1 und C2 vollständig getrennt untersucht werden können. Im Allgemeinen erwiesen sich die Saugelektrodenmessungen als sehr aufwendig. Durch die Isolierung der C1 und C2 mRNA aus *C.reinhardtii* im Jahre 2002 [19, 20, 22, 21] können solche Fragestellungen in heterologen Expressionssystemen wie HEK Zellen untersucht werden.

5.2 Die Kristallstruktur der Kanalrhodopsinchimäre C1C2-52

Die Kristallstruktur der Kanalrhodopsinchimäre C1C2-52 (342 As) wurde Ende Januar 2012 von der Arbeitsgruppe um O. Nureki mit einer Auflösung von 2.3 Å veröffentlicht (siehe Abbildung 5.1) [25]. Die Kristallstruktur stellt einen Meilenstein in der ChR Forschung dar und eröffnet nicht nur neue, vielversprechende Möglichkeiten, die verschiedensten Eigenschaften der ChRs gezielt zu verändern, sondern erlaubt es auch, die bisherigen Resultate neu zu bewerten.

Die Struktur wurde als Dimer kristallisiert. Die Pore zum Leiten der Ionen liegt aber im jeweiligen Monomer. Die Kristallstruktur liegt im nicht-leitenden, geschlossenem Zustand vor. Dass ChRs als Dimer in der Membran vorliegen, wurde bereits in einer elektronenmikroskopischen Untersuchung mit einer Auflösung von 6 Å beobachtet [146]. Die Dimerisierungsschnittstelle besteht aus dem N-Terminus, der extrazellulären Schleife zwischen Helix B und C und den Helices C und D. Zwar besitzt die Struktur starke Ähnlichkeit mit BR und mit einigen Abstrichen auch zum visuellen Rhodopsin (Rh),

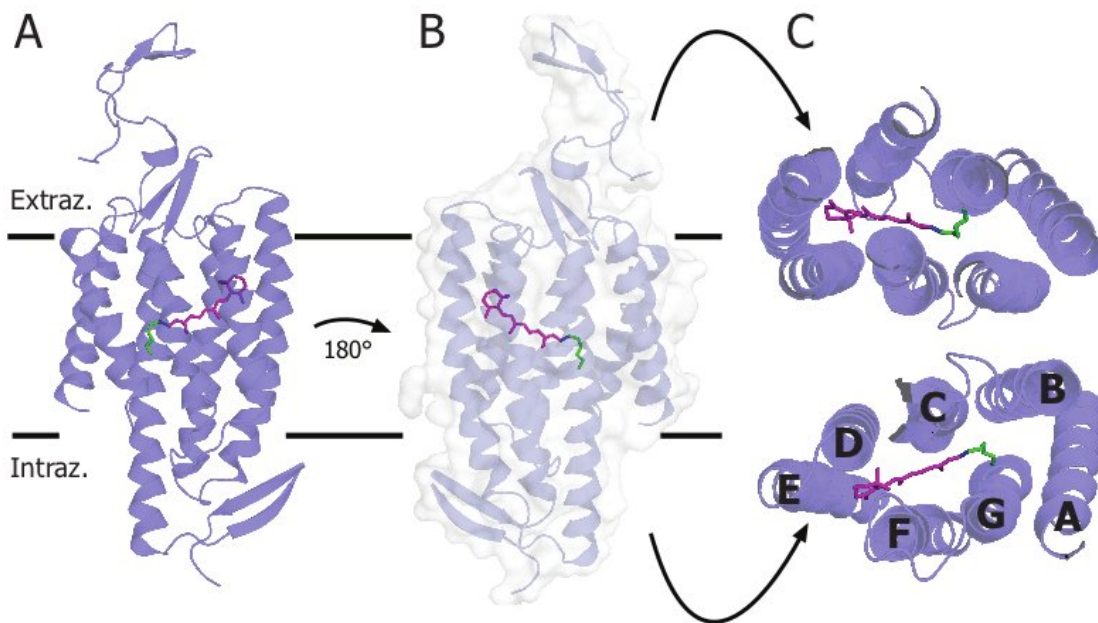


Abbildung 5.1: Kristallstruktur von der ChR Chimäre C1C2-52 in einer Auflösung von 2.3Å. **A** zeigt die Seitenansicht von C1C2-52, wobei Helix B,C und D nach vorne orientiert sind. In **B** ist die um 180° gedrehte Seitenansicht der Darstellung aus A gezeigt, so dass Helix F und G nach vorne weisen. In **C** ist die Draufsicht auf die extrazelluläre Seite gezeigt (*oben*) beziehungsweise auf die intrazelluläre Seite (*unten*). Die Beschriftung der Helices ist in der intrazellulären Draufsicht gezeigt (pdb: 3UG9).

dennoch sind einige Besonderheiten zu erkennen:

- Sie besitzt große strukturierte N- und C-terminale Domänen.
- Extrazelluläre Schleife zwischen Helix B und C bilden ein anti- paralleles Faltblatt aus.
- Die Helix G ragt 18 Å von der Membranoberfläche tief in den intrazellulären Raum hinein.
- Die Pore wird aus Helix A, B, C und G gebildet. Insbesondere Helix A und B sind jeweils 3 beziehungsweise 4.1 Å gegenüber den Helices von BR nach außen verdreht.
- Die Pore ist mit dem Glutamatmotiv aus Helix B und anderen polaren As (siehe Abbildung 5.2) ausstaffiert.
- Das Öffnen der Pore könnte mittels 3 molekularer Schließmechanismen geschehen: einem extrazellulären (Q95, E136, E140, R159 und S284), einem mittleren (S102, E129, N297) und einem intrazellulären (Y109, E122, H173, H311), wobei noch zu untersuchen bleibt, welcher tatsächlich das Öffnen der Pore verursacht.
- D292 ist der primäre Protonenakzeptor bei der Isomerisierung des Retinals.

Durch die Kristallstruktur konnte nun erstmalig nachvollzogen werden, wo sich die eigentlich Ionen-leitende Pore der licht-regulierten Ionenkanäle befindet. Wie aus den Sequenzvergleichen mit anderen mikrobiellen Rhodopsinen bereits zu ersehen war, zeigen sich besonders große Sequenzunterschiede zu anderen Rhodopsinen in diesen beiden ersten Helices. Diese beiden Helices sind im Vergleich zu der BR Struktur weiter nach außen verdreht. Es kann vermutet werden, dass die Helices A und B über drei Aminosäurenetzwerke im extrazellulären -, inneren - und intrazellulären Abschnitt des Kanals in Position gehalten werden (siehe Abbildung 5.2). Durch die Protonierung des primären Protonenakzeptors D292 würden dann die Wasserstoffbrücken dieser Netzwerke neu formiert werden und die beiden Helices sich weiter verdrehen und schließlich die Pore öffnen.

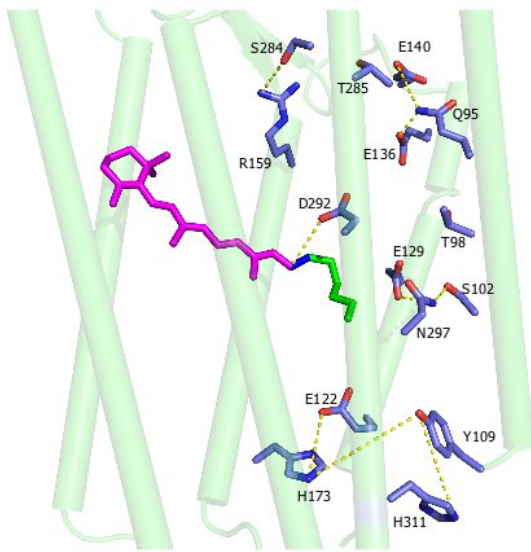


Abbildung 5.2: Darstellung der Kristallstruktur von C1C2-52 in denen die poren-formenden polaren As hervorgehoben sind. Die gezeigten As liegen zum größten Teil in Helix A, B, C, G und bilden eine hydrophile Pore. Nahe dem Protonenakzeptor D292 wird das bei ChR streng konservierte N297 von E129 und S102 über Wasserstoffbrückebindung koordiniert. Extrazellulär positionieren E136 und E140 das Q95 und ziehen dabei Helix A ins Innere der Pore. Auch im intrazellulären Schloss wird Helix A über Y109 und Helix B über E122 mit den Wasserstoffbrückenakzeptoren H311 beziehungsweise H174 näher in die Pore gezogen [25].

5.3 Etablierung der Patch-Clamp Methode und Charakterisierung von *Chlamydomonas reinhardtii* Kanalrhodopsin 2

Die Kultivierung der HEK Zellen zur Expression von ChRs erfolgte unter den standardisierten Bedingungen einer typischen Zellkultur. Die Zugabe von $1 \mu M$ *all-trans* Retinal hatte keinen sichtbaren Einfluss auf die Morphologie oder das Wachstum der Zellen. Um hohe Photoströme zu erzielen, die das Messen und Auswerten erleichtern, erwies sich die Lipofektion als Transfektionsmethode am effektivsten.

Die Größe des Photostromes ist abhängig von der Zellgröße. Durch Normalisierung auf die Membrankapazität konnte die Streuung zwischen den einzelnen Messungen verkleinert werden (siehe Abbildung 3.9). Insbesondere, wenn nur wenige Zellen gemessen wurden, ist die Betrachtung der so berechneten Stromdichten (J) aussagekräftiger als die des Photostromes. Im C2, dem Modellkonstrukt, beträgt der mittlere transiente Photostrom (I_{Spitze}) -0.8 nA . Vergleichbare Messungen in der Literatur weisen einen mittleren transienten Photostrom von -0.73 nA [58] auf und zeugen von einer vergleichbaren Expression zu dem in dieser Arbeit etablierten Zellsystem.

Bei der kinetischen Auswertung der Photostromspuren streuten die kinetischen

Parameter der Stichproben in HEK Zellen stärker als im Falle von Oozytenmessungen. Der Durchschnitt der Standardabweichung für die kinetischen Parameter in den HEK-Zellmessungen lag bei ~ 23 % wohingegen der von Oozyten nur bei ~ 10 % lag. Das zeitliche Auflösungsvermögen einer Patch-Clamp Messung ist unter anderem abhängig von guten Abdichtwiderständen (R_S) zwischen Pipette und Zellmembran. Die Pipettenkapazität (C_P) und R_S wirken dabei wie ein analoger Tiefpassfilter mit einer Zeitkonstanten von $\tau = R_S \cdot C_P$, die die kinetischen Parameter verschleifen kann. Hinzu kommt, dass bei hohen Pipettenwiderständen (R_P) oder auch schlechten R_S die zu klemmende Membranspannung nicht erreicht und das Photostromprofil nur scheinbar bei einer bestimmten Membranspannung gemessen wird. Da die kinetischen Parameter der ChRs spannungsabhängig sind, könnte diese elektrische Unzulänglichkeit für die größere Streuung verantwortlich sein. Dieses Problem tritt bei den Zwei-Elektrodenmessungen in Oozyten nicht auf, da die Strom- und Spannungsmessung mit je einer Elektrode durchgeführt werden. Somit scheinen Oozytenmessungen für moderate Signale mit Kinetiken $\leq Hz$ beziehungsweise $\geq 10 ms$ aufgrund der höheren Reproduzierbarkeit geeigneter zu sein. Bei schnelleren Messungen kann die große Membrankapazität der Oozyten störend.

Die mittleren kinetischen Parameter bei Belichtungspulsen von 300 ms von C2 exprimierenden HEK Zellen ergaben $\tau_{Iak} = 65 ms$, $\tau_{Abk} = 21 ms$, $\tau_{Erk, -60mV} = 6 s$ und eine Inaktivierung von 72 %. Diese grundlegenden Parameter wurden unter Standardbedingungen gemessen (pH_e 7.2, 140 mM NaCl) und stehen in sehr guter Übereinstimmung mit bereits publizierten Werten für C2 unter ähnlichen Bedingungen [20, 28, 49, 50, 46, 137]. Die in Oozyten im Laserexperiment bestimmte immanente Abklingkinetik ($\tau_{Abk,ima}$) ist kleiner als der monoexponentielle τ_{Abk} aus der 300 ms Pulsbelichtung (Vergleiche beispielsweise Tabelle A.2). Bei mechanistischen Betrachtungen, in denen der τ_{Abk} biexponentiel bestimmt wird, ist die schnellere Komponente (τ_{Abk1}) nahe dem mit Laser bestimmten $\tau_{Abk,ima}$. Da im Laserexperiment jedes Molekül nur einmal aus D_1 angeregt wird und es zu keinen weiteren photochemischen Reaktionen kommt, beschreibt der $\tau_{Abk,ima}$ zum größten Teil die

Kinetik zwischen O_1 und D_1 (4-Zustandsmodell). Der so bestimmte $\tau_{O1 \rightarrow D1}$ von 8 ms ist in guter Übereinstimmung mit dem von Bamann *et al.* bestimmten 10 ms aus einem ähnlichen Experiment in HEK Zellen [30].

Das Oozytensystem mit 7 ns Laser wurde auch mit der Absicht aufgebaut, die Aktivierungskinetik (τ_{Akt}) erstmalig zu bestimmen beziehungsweise den t_{max} weiter einzuengen. Das Messprinzip eines Zwei-Elektrodenverstärkers und die große Membrankapazität von Oozyten widersprechen zwar schnellen Messungen, aber bei optimaler Justage sind laut Literatur temporal hochaufgelöste Messungen von Signalen $\leq 100 \mu s$ mit Zwei-Elektrodenverstärkern möglich [147]. Die Anstiegskinetik konnte aufgrund eines Laserartefakts und unzureichenden Kapazitätskompensationen nicht bestimmt werden. Lediglich der t_{max} , also die Zeitdauer von Laserblitz bis zum maximalen Strom, konnte für die zu C2 sehr ähnlichen Chimäre V1V2-25 (siehe Abbildung 4.10) am Laser auf $\leq 200 \mu s$ eingeschränkt werden. Somit konnte die Abschätzung des t_{max} aus *C.reinhardtii* von 1996 nicht weiter eingeengt werden [54]. Zeitlich besser aufgelöste spektroskopische Untersuchungen an dieser Chimäre bestimmten das Entstehen des P390 Zustandes nach $\sim 4 \mu s$ und des P520 Zustandes nach 150 – 200 μs [31, 30]. Die mit dem Laser bestimmte obere Grenze des elektrophysiologischen Photostromanstieges von 200 μs ist damit konsistent zu der Hypothese, dass beide spektroskopischen Zustände elektrisch leitend sein können.

Die Wellenlängenabhängigkeit des Photostromes von den ChRs konnte in der hier vorgelegten Arbeit so genau wie vorher noch nie bestimmt werden (Vergleiche Abbildung 1.11 mit Abbildung 4.6 und Literatur [111, 52, 137]. Die Spektren wurden mit einer Auflösung von 5 nm aufgenommen und die maximale Absorption konnte bei gut exprimierenden Konstrukten in der Regel mit einem Standardfehler von $\leq 2 \text{ nm}$ angegeben werden. Der λ_{max} von C2 beträgt 465 nm und stimmt mit einer Spannbreite von $\pm 10 \text{ nm}$ gut mit den Literaturwerten überein [20, 148, 70, 137].

Der entscheidende Vorteil des HEK Zellsystems gegenüber dem Oozytensystem war die komplette Kontrolle der extra- und intrazellulären Pufferzusammensetzung. Unter den in Abschnitt 3.5 aufgeführten Vereinfachungen der Goldmann-Hodgkin-Katz

Gleichung konnte ein Permeabilitätsverhältnis, P_{H^+}/P_{Na^+} , von $3.6 \cdot 10^6$ bestimmt werden. Dieser Wert ist ~ 3 x höher als der von Nagel *et al.* oder Lin *et al.* bestimmte, was wohl auf unterschiedliche Konzentrationen von divalenten Kationen im Puffer zurückzuführen ist [58, 111]. Trotz der deutlich höheren Permeabilität für H^+ wird aber unter physiologischen Bedingungen ein entscheidender Anteil des Photostromes durch Na^+ getragen. Hierfür ist zum einem die $\sim 100\,000$ x höhere Konzentration von Na^+ gegenüber H^+ -Ionen im Standardpuffer bei pH 7.2 verantwortlich und zum anderen auch der größere chemische Gradient für Na^+ .

Bei Untersuchungen des Umkehrpotentials von transienten und stationären Photoströmen mit kleinen Spannungsschritten (siehe Abbildung 4.4 B) konnten verschiedene U_{Ukp} für beide Anteile bestimmt werden. Dieser Unterschied von 9 mV zwischen $U_{Ukp,stat} - U_{Ukp,trans}$ bei pH 9.0 verschwand bei höheren H^+ Konzentrationen. Da H^+ und Na^+ nicht unabhängig voneinander geleitet werden, wie es die Goldman-Hodgkin-Katz Gleichung voraussetzt [131], wurde in Zusammenarbeit mit D. Gradmann ein enzymatisches 4-Zustandsmodell entwickelt, in dem die Leitfähigkeit der jeweiligen Ionen durch einen Satz von Geschwindigkeitskonstanten beschrieben wird [138]. In einer detaillierten Auswertung konnten wir zeigen, dass der frühe, für den transienten Photostrom verantwortliche O_1 Zustand ein P_{H^+}/P_{Na^+} von $2.3 \cdot 10^6$ besitzt und der Quotient $P_{Ca^{2+}}/P_{Na^+}$ 0.0018 beträgt. Dagegen besitzt der O_2 Zustand, der im stationären Photostrom auftritt, ein ~ 2 x größeres P_{H^+}/P_{Na^+} Verhältnis und ein 2 x niedrigeres für $P_{Ca^{2+}}/P_{Na^+}$ [138]. Das Bestimmen von unterschiedlichen Selektivitäten für die beiden leitenden Zustände stellt einen weiteren wichtigen Befund für das 4-Zustandsmodell dar und unterstützt die Hypothese zweier Leitfähigkeiten im ChR. Implikationen für die optogenetische Anwendung hat diese Untersuchung nur insofern, dass unter physiologischen Bedingungen bei kurzen Lichtstimulationen das Selektivitätsverhältnis von Na^+ gegenüber H^+ physiologischer als bei längeren Pulsen ist. Der absolute Anteil der transportierten Ionen pro Zeit ist aber aufgrund der Inaktivierung von bis zu 72 % für C2 im O_1 größer.

In der Alge führen Inaktivierung und die verringerte Selektivität dazu, dass insgesamt

weniger Ca^{2+} bei längerer Belichtung in das Zellinnere fließt und somit auch weniger Ca^{2+} unter Energieverbrauch wieder heraustransportiert werden muss.

5.4 Charakterisierung von *Volvox carteri* Kanalrhodopsinen

Mit den etablierten und getesten Patch-Clamp Apparaturen wurde nun erstmalig die cDNA von *VOP3* und *VOP4* aus der mehrzelligen Alge *V. carteri* untersucht. Beide ChRs ließen sich in HEK Zellen exprimieren und konnten eindeutig als lichtaktivierte Ionenkanäle bestätigt werden.

V2 ähnelt hinsichtlich des Photostromprofils, der Absorption wie auch in der Kinetik stark dem Verhalten von C2 (Vergleiche Tabelle 4.1). Eine transiente Stromspitze, die bei hohen Lichtintensitäten nach Ausschalten der Belichtung beobachtet wurde, stellt die einzige Besonderheit von V2 dar (siehe Abbildung 4.7). Hier kann spekuliert werden, dass die Stromspitze durch einen Übergang O1 zum schwächer leitenden O2 nach Ausschalten des Lichtes bedingt ist. Diese würde auch ein weiteres Indiz für ein nicht photochemisches Gleichgewicht von $\text{P390} \rightleftharpoons \text{P520}$ sein, welches bei Nikolic *et al.* diskutiert wird [28]. Das Kanalrhodopsin 1 von *V. carteri* zeigt im Allgemeinen eine 5 – 10 x verlangsamte Kinetik gegenüber C1 beziehungsweise C2. Die weitere Besonderheit von V1 ist das um 70 nm gegenüber C2 verschobene Aktionsspektrum mit einem ungefähren λ_{max} von 535 nm. Durch die hochaufgelösten Aktionsspektren von V1 ließen sich zwei unterschiedlich absorbierende Isoformen mit jeweils einem λ_{max} von 488 und 546 nm identifizieren (siehe Abbildung 4.6 A). Das Gleichgewicht zwischen beiden Isoformen ist pH-Wert abhängig und verschiebt sich bei geringen H^+ -Konzentrationen zu niedrigen Wellenlängen. Das mittels Patch-Clamp aufgenommene Aktionsspektrum lässt sich gut mit dem Absorptionsspektrum des aufgereinigten Proteins vergleichen [13]. In der Abbildung 5.4 A sind die Absorptionsspektren am aufgereinigten V1 bei unterschiedlichen H^+ Konzentrationen gezeigt. Das Absorptionsspektrum verschiebt sich bei einem alkalischen pH-Wert hypsochrom. Die blaue Flanke des Aktionsspektrums überlagert sich mit dem alkalischen Absorptionsspektrum und im Roten mit dem des sauren Absorptionsspektrums. In der HEK Zellmembran liegen

somit die protonierte und deprotonierte Isoform von V1 gleichzeitig vor, was auch das breite Aktionsspektrum erklärt. Der pKs-Wert kann auf Basis der titrierten UV-Vis Spektren und dem physiologischen pH-Wert bei den elektrophysiologischen Messungen auf ~ 7 abgeschätzt werden. In C1 konnte gezeigt werden, dass die Mutation E87Q die protochrome Verschiebung aufhebt. Die gleiche Mutation in V1 hat keinen Einfluss auf das Absorptionsverhalten. Auch die Breite des Spektrums wird nicht verändert. Da die protochrome Verschiebung von V1 durch die extrazelluläre H^+ Konzentration beeinflusst wird, kann vermutet werden, dass die hierfür verantwortliche As im extrazellulären Bereich von V1 liegt. Das Spektrum von V1 verschiebt sich zu kürzeren Wellenlängen beim Übergang des pH-Wertes von 7.0 auf 8.0 (siehe Abbildung 5.4 A) [13]. Dagegen verschiebt sich das Spektrum von C1 ins Blaue beim Übergang von pH 4.0 auf 7.2 [46]. Mit Hilfe der Kristallstruktur konnten nun interessante As in einer Umgebung von 4 Å³ um E87 bestimmt werden. Hierbei fallen besonders 3 As im extrazellulären Abschnitt von Helix G auf, die in V1 S236, P237, Y238 und in C1 N281, Q282, F283 sind. Eine Wasserstoffbrückenbindung wäre im C1 zwischen E87 und Q282 möglich (2.6 Å. Mit einem angenommenen pKs-Wert für E87 von ~ 4.5 würde diese unter sauren Bedingungen zusammenbrechen und die Interaktion zwischen Helix A und G würde sich verringern. In V1 wäre solch eine Bindung aufgrund der vorhandenen As nicht möglich, aber dafür könnte über V1 K44 (C1 K88) mit Y238 (4.5 Å) eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen Helix A und G aufgebaut werden. Eine Bindung, die in C1 aufgrund von F283 nicht möglich wäre. Durch den hohen pKs Wert von Lys kann diese Bindung aber erst im alkalischen Milieu entstehen und die Interaktion zwischen Helix A und G würde sich dann erst festigen. Die Verschiebung des Aktionsspektrums wäre in dieser Erklärung also auf eine Annäherung von Helix A und G zurückzuführen und ist konform mit den jeweiligen protochromen Effekten. Die gute Übereinstimmung des mittels Patch-Clamp aufgenommenen Aktionsspektrums mit der Absorptionsspektroskopie ist unter Berücksichtigung der Tatsache beeindruckend, dass für das Aktionsspektrum $\sim 10^{12}$ x weniger Rhodopsinmoleküle benötigt wurden (siehe Abbildung 5.4 A). Im Falle einer solchen funktionellen

elektrophysiologischen Spektroskopie an elektrogenen Photorezeptoren können spektroskopische Eigenschaften untersucht beziehungsweise komplementäre Informationen zur herkömmlichen Spektroskopie unter natürlicheren Bedingungen in der Membran gewonnen werden.

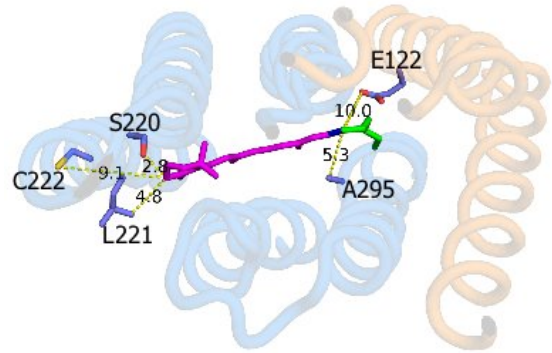
V1 Position	C2 Position	C1V1 Mutation	$\Delta\lambda_{max}$ in C1V1 (nm)
S176	G181	S220G	- 13
S178	C183	S222C	unfunktionell
L177	L182	<i>L221T</i>	+ 5
A251	S256	A295S	- 18

Tabelle 5.1: Auflistung der As in V1 und C2, deren entsprechender Austausch in C1V1 Einfluss auf λ_{max} hatte.

Einige der As, die für die 70 nm Rotverschiebung von V1 gegenüber C2 verantwortlich sind, konnten durch die Mutationsstudien an C1V1 identifiziert werden. Der Bereich 176 – 178 in V1 befindet sich in Helix E und liegt auf der Höhe des β -Iononringes. Im Vergleich mit C2 fällt auf, dass sich bei V1 in den entsprechenden Bereich polarere As befinden. Auch hier bestätigt sich die These, dass für die verschiedenen Absorptionen der mikrobiellen Rhodopsine nicht die As entscheidend sind, die die Geometrie des Retinals verändern, sondern jene, die einen Einfluss auf die elektrostatische Verteilung entlang des Retinals haben. Daher bewirkt die Mutation S220G in C1V1, also der Austausch der As von V1 zur entsprechenden von C2, eine hypsochrome Verschiebung von 13 nm. In der mutierten Kristallstruktur führt dieser Austausch nicht nur zum Verringern der Ladung, sondern geht auch mit einer Vergrößerung des Abstandes zum β -Iononring von 2.8 auf 4.6 Å einher. Der Austausch der übernächsten Position von S222 zu Cys führt zu einer unfunktionellen Mutante. Dieser Befund ist insbesondere überraschend, da die Kristallstruktur zum einen zeigt, dass das Ser nach außen gerichtet ist und zum anderen, dass der Austausch mit keiner Größenveränderung einhergeht. Eine funktionell entscheidende Interaktion des S222 mit Lipiden der Membran kann nicht ausgeschlossen werden. Das von S220 und S222 eingerahmte Leu auf Position

221 ist sowohl in V1 als auch in C2 vorhanden. Die Mutation L221T, also der Austausch zu einer polareren Aminosäure ähnlicher Größe, führt daher zu einer 5 nm Rotverschiebung in C1V1. Hier tritt der umgekehrte Effekt der S220G Mutation auf. Das Einbringen der Hydroxylgruppe vom Thr in die Nähe des β -Iononringes verändert die elektrostatische Verteilung entlang des Retinals. Analoge Überlegungen lassen auch verstehen, dass ein unpolares Ala in V1 anstelle eines polaren Ser in C2 an direkt benachbarter Position zum *RSB*-Lys ursächlich für die Rotverschiebung in V1 sind. Die beiden hier diskutierten Punkte sind sicherlich notwendig, aber nicht hinreichend, um die Rotverschiebung von 70 nm zwischen C2 und V1 zu erklären.

Abbildung 5.3: Zeigt eine Draufsicht auf die Kristallstruktur von C1C2-52, wobei die zu C1V1-25 verschiedenen As eingeführt worden sind. Zur besseren Betrachtung wurden die extrazellulären Bereiche abgeschnitten. Die Abstände zwischen den As und dem Retinal sind in Å angegeben.



Mit unseren Kooperationspartnern um K. Deisseroth konnte wir die Möglichkeit aufzeigen, dass das rotverschobene Aktionsspektrum von V1 eine interessante optogenetische Ergänzung zu C2 ist [136]. Wie in Abbildung 5.4 **A** und **C** gezeigt, kann V1 in Pyramidenzellen exprimiert und bei einer 590 nm Belichtung APs ausgelöst werden. Im Zusammenspiel mit C2 konnte gezeigt werden, dass bei einer Lichtintensität von $23 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ zwar in C2-exprimierende Neuronen APs ausgelöst werden, aber bei V1-exprimierenden Neuronen bewirkt diese Lichtintensität eine unerschwellige Depolarisierung. Bei 590 nm konnten nur V1-exprimierende Neuronen aktiviert werden. Um C2 beziehungsweise V1 exprimierende Neuronen mit blauem beziehungsweise mit gelben Licht selektiv zu aktivieren, sollten die Photoströme von beiden Stimulatoren ungefähr gleich groß sein. Da V1 in HEK Zellen nur einen Photostrom von $\sim -0.3 \text{ nA}$ und in Neuronen von $\sim -0.2 \text{ nA}$ besitzt, sind diese interessanten optogenetischen Experimente

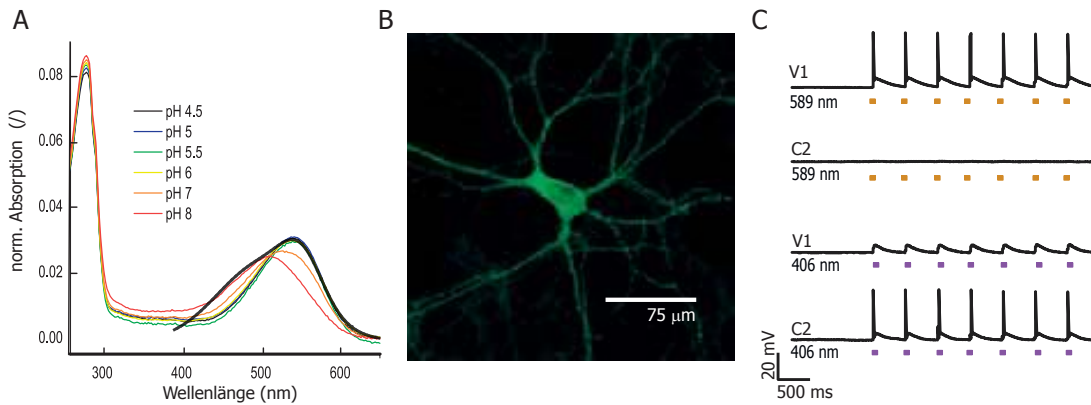


Abbildung 5.4: Absorptionsspektrum von V1 und Anwendung in Neuronen. In **A** sind die Dunkelspektren vom aufgereinigtem V1 bei verschiedenen pH-Werten gezeigt (verändert nach [13]). Das Aktionsspektrum von V1 aus Abbildung 4.6 B ist in grau über die Absorptionsspektren superpositioniert. **B** zeigt die Fluoreszenz einer α CAMKII-V1-eYFP exprimierender Pyramidenzelle im Hippocampus der Maus. **C** illustriert Patch-Clamp Messungen in Pyramidenzellen im Strom-geklemmten Modus bei denen APs mit 5 ms Lichtpulsen bei 589 nm ($120 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$) und C2 bei 406 nm ($23 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$) ausgelöst wurden (verändert nach [136]).

nur sehr schwer möglich. Mit der in dieser Arbeit aufgeführten Chimärenstrategie und der daraus resultierenden C1V1 Chimäre mit der rotverschobenen Absorption und großen Photoströmen wurde diese Limitierung aufgehoben.

5.5 Design der Kanalrhodopsinchimäre C1V1-25

Die Strategie, Helices von V1 mit den entsprechenden von C1, V2 beziehungsweise C2 auszutauschen, führte schlussendlich zu der gut exprimierenden Chimäre C1V1-25. Beim Austauschen der Helices stellte sich heraus, dass für die Farbverschiebung insbesondere die Helices F und G von entscheidender Bedeutung sind. Hierfür ist die Chimäre V1V2-52 ein eindrucksvoller Befund in dem durch den Austausch der beiden C-terminalen Helices die Absorption wieder ins Blaue verschoben wird. Deswegen war es wichtig, für eine rotverschobene Chimäre die C-terminalen Helices von V1 zu verwenden. Die Helices C, D und E (Vergleiche Chimären V1V2-223, V1C2-223, V1V2-133 und V1V2-421 in Tabelle 4.1) haben zwar Einfluss auf die Kinetik, spielen aber eine untergeordnete

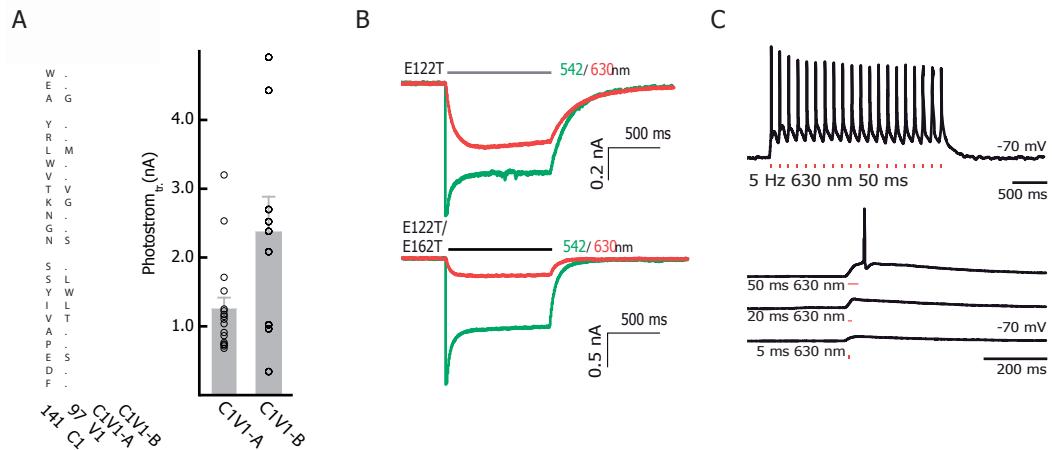


Abbildung 5.5: Zeigt die beiden Spleißvarianten von C1V1 und ihre optogenetische Anwendung in Neuronen. **A** stellt die Schnittstellen zwischen C1 und V1 für die beiden Spleißvarianten dar. Der Bereich kodiert zwei kurze anti-parallele β -Faltblätter [25]. **B** zeigt Photostromprofile bei 542 und 630 nm ($320 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ für 542 und $770 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ für 630 nm) für die beiden Mutanten C1V1-B E122T und C1V1-B E122T/E162T in Pyramidenzellen über den α CAMKII Promoter exprimiert. **C** zeigt die Abhängigkeit der Membrandepolarisierung von der Pulsbreite des Anregungslichtes bei 630 nm. Ein zuverlässiges Auslösen von APs mit 630 nm ist, wie die obere Stromspur zeigt, bei einer Pulsbreite von 50 ms möglich

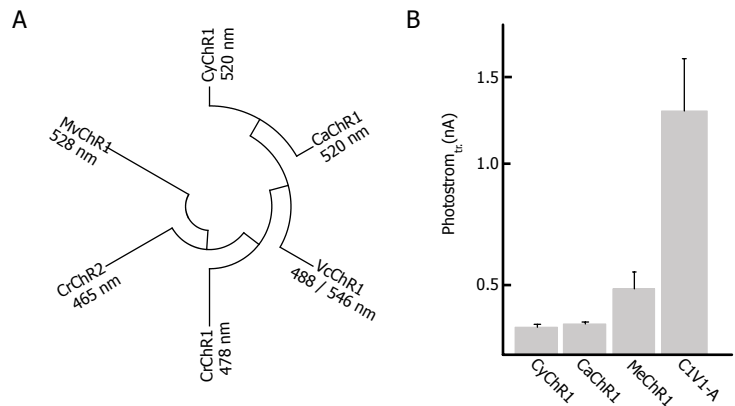
Rolle bei der Expression oder Absorption. Entscheidend für eine hohe Expression beziehungsweise Membranintegration scheint der N-Terminus mit den beiden Helices A und B zu sein. Beide mit C1 beginnenden N-terminalen C1V1 Chimären (C1V1-25 und C1V1-52) besitzen eine bessere Membranintegration als ihre ursprünglichen Wildtypen. Dadurch bestätigen sich frühere Studien in denen C1 beginnende Chimären, wie zum Beispiel die kristallisierte C1C2-52, bessere Membranintegration und auch einen größeren Photostrom aufwiesen als C1 oder C2 [46, 58, 111]. Es ist wahrscheinlich, dass C1 aufgrund des um 39 As längeren N-Terminus im Vergleich zu anderen ChRs zusätzliche Sequenzinformationen besitzt, die eine bessere Proteinfaltung oder Membranintegration ermöglichen. In einer kürzlich veröffentlichten Studie wird eine kurze α -Helix im N-Terminus von C1 postuliert, die angeblich ursächlich für die gute Membranintegration sein soll [149]. Die Kristallstruktur legt nahe, dass der N-Terminus aller ChRs eine kurze 3_{10} -Helix mit zwei kurzen β -Faltblättern ausbildet. Dieses Faltungsmotiv dient als Dimerisierungsschnittstelle [25]. Zwar konnten die einzigartigen

39 N-terminalen As von C1 aufgrund der hohen Flexibilität strukturell nicht aufgelöst werden, aber auch in der Veröffentlichung von Kato *et al.* wird eine Funktion als Signalpeptid vermutet [25]. Auf den ersten Blick könnte man argumentieren, dass im Falle von C1 ein schlecht faltender C-Terminus gegen einen besser faltenden C-Terminus von V1 ausgetauscht wurde. Von V1 aus argumentierend bedeutet es auch, dass ein gut faltender N-Terminus von C1 gegen einen schlecht faltenden N-Terminus von V1 eingetauscht wurde. Gegen diese Hypothese spricht aber die gute Membranständigkeit der V1V2-25 Chimäre, in der die N-terminalen Helices A und B von V1 zu einem 1.5 x höheren Photostrom gegenüber dem bereits gut exprimierenden V2 führen. Diese Befunde deuten darauf hin, dass neben dem wichtigen N-Terminus auch die Interaktion zwischen Helix A und G von entscheidender Bedeutung ist. Dass die gute Membranintegration von C1V1-25 einer komplexen und multikausalen Erklärung bedarf, wird durch die zweite C1V1 Chimäre nämlich C1V1-52 verdeutlicht. Hier liegt auch wie bei C1V1-25 ein N-terminaler C1 Abschnitt vor. Auch die Interaktion zwischen Helix A und G ist die gleiche. Trotzdem besitzt die Chimäre C1V1-52 einen ~ 10 x kleineren Photostrom von -0.17 nA als C1V1-25 bei sehr guter Membranintegration. In einer C1V1-25 Spleißvariante, in der der C1 Anteil von As 146 auf 163 verlängert wurde (C1V1-B), erstreckt sich die C1 Sequenz bis zur Hälfte von Helix C. Da jetzt durch die Kristallstruktur die meisten Strukturmodule in der Aminosäuresequenz bekannt sind, wird ersichtlich, dass beim Erweitern des C1 Anteils in der C1V1-B Spleißvariante die beiden kurzen Dimerisierungs- β -Faltblätter gegen jene von C1 ausgetauscht wurden (siehe Sequenzvergleich A.2 und Abbildung 5.5 A). Da die B Variante, wie in Abbildung 5.5 A gezeigt, eine 2 x so hohe Photostromamplitude wie die C1V1-A Variante besitzt, scheinen die β -Faltblätter und damit die Dimerisierung auch einen wichtigen Einfluss auf die Membranintegration zu haben. Beim Vergleich dieses Sequenzabschnittes fällt auf, dass C1 vorzugsweise polarere As als V1 besitzt (Y148W, S149L, K154G und T155V), was zumindest die hydrophoben Wechselwirkungen der Dimerisierungsgrenzfläche zwischen den Monomeren in der C1V1-B Variante schwächen würde. Da in Neuronen Konstrukte mit hohen Photostromamplituden die Menge an

benötigtem Licht verringern, um APs auszulösen, findet die C1V1-B Variante in der Optogenetik stärkere Verbreitung (siehe Abbildung 5.5) [150].

In einer aktuellen Publikation wurden 3 um 530 nm absorbierende ChRs aus verschiedenen Organismen isoliert (siehe Abbildung 5.6) [151, 152]. Am interessantesten ist hierbei das MvChR1, da es phylogenetisch am weitesten von allen anderen ChRs entfernt ist (siehe Abbildung 5.6 A). Trotz ihrer geringen Photostromamplituden im Vergleich zu C1V1 sind MvChR1, CyChR1 und CaChR1 für eine spektrale Verschiebung über 550 nm interessant, da Mutationen wie G220S, G202S, W/F221T und S295A (C1V1 Zählweise), in Anlehnung an hier beschriebene C1V1 Mutationen, Möglichkeiten bieten, die Spektren bathochrom zu verschieben. Das in dieser Arbeit vorgestellte Prinzip zum Verbessern der Membranintegration über das Austauschen N-terminaler Sequenzen mit den entsprechenden Sequenzabschnitten von C1 erlaubt es wahrscheinlich auch die Photoströme von MvChR1, CyChR1 und CaChR1 zu erhöhen.

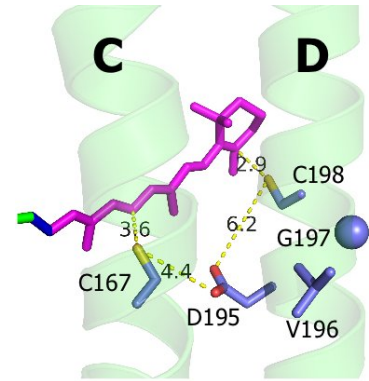
Abbildung 5.6: Vergleich ChR1s mit rotverschobenen Spektren von *Mesostigma viride* (MvChR1), *C. augustae* (CaChR1), *C. yellowstonensis* (CyChR1), *C. reinhardtii* (CrChR1 und CrChR2) und *V. carteri* (VcChR1). **A** zeigt einen zirkulären phylogenetischen Baum nach Jones *et al.* [153]. **B** Photostromamplituden der ChR1 Varianten im Vergleich mit C1V1 (Da die Photostromamplituden an verschiedenen Anlagen gemessen wurden, diente das jeweils als Standard gemessene CrChR1 als Referenz) [151].



5.6 Anwendungsbezogene Optimierung der Kanalrhodopsin Variante C1V1-25

Obwohl C1V1-25 durch seine rotverschobene Absorption bereits ein großes Anwendungspotential besitzt, wurden durch Mutationen die Kinetik und die Absorption für eine optimale optogenetische Anwendung weiter angepasst. Wie oben bereits diskutiert (siehe Abschnitt 5.4), konnte die Absorption durch die Mutation C1V1 E122T um 5 nm bathochrom verschoben werden ohne dabei die große Photostromamplitude einzubüßen. Im HR ist die homologe Position als eine Cl⁻ Bindungsstelle bereits identifiziert und bewirkt nach Bindung von Cl⁻ eine Blauverschiebung [154]. Bei Kato *et al.* wird E122 als potentieller Protonendonator zur Reprotonierung der RSB diskutiert, wobei E122 durch H173 protoniert wird. Da die Mutation E122T im C1V1-25 nur einen Einfluss auf die Absorption, nicht aber auf die τ_{Abk} oder I_{Spitze} hat, ist eine solche Funktion eher unwahrscheinlich. Da die Entfernung zwischen E122 und RSB ~ 10 Å ist, wäre nur eine vermittelte Interaktion denkbar. Wahrscheinlicher ist es, dass durch die Mutation die Wasserstoffbrückenbindung zu H173 verändert wird und es dadurch zu einer größeren Konformationsänderung kommt, die dann verantwortlich für die Rotverschiebung ist. Entsprechend dieser Argumentation führt die bekannte C2 H134R (H173R) Mutation auch zu einer schwachen Blauverschiebung von ~ 4 nm [52]. Zwar wurde durch die Struktur das E162 als primärer Protonenakzeptor verworfen, aber die Position ist nur 3.6 Å von der RSBH⁺ entfernt. Da durch die Mutation E162T in C1V1 die Hydroxylgruppe weiter von der RSBH⁺ entfernt wird und sich dadurch die Ladung in diesem Bereich verringert, ist die Blauverschiebung um 14 nm im Einklang mit der in der Einleitung erwähnten Theorie (siehe Abschnitt 1.2.3) [38]. Das Aktionsspektrum ist neben dieser Blauverschiebung auch leicht verbreitert. Schwieriger ist es, die Rotverschiebung um ~ 20 nm im C2 zu erklären, wenn die homologe Mutation (C2 E123T) dort eingeführt wird. Es wurde spekuliert, dass C1 einen anderen Gegenionenkomplex als C2 besitzt, was eventuell für diese unterschiedlichen Absorptionsveränderungen

Abbildung 5.7: Zeigt die Geometrie zwischen den für SFR relevanten As C167, D195 und T198 mit entsprechenden Abständen (Å) zueinander und zum Retinal. Des Weiteren werden die beiden As V196 und G197 gezeigt, deren Mutation zu Iso beziehungsweise Ala den Photozyklus beschleunigt. Die C1V1-25 spezifischen As wurden in die Kristallstruktur von C1C2-52 eingeführt, wobei jeweils die energieärmste Konformation gewählt wurde.



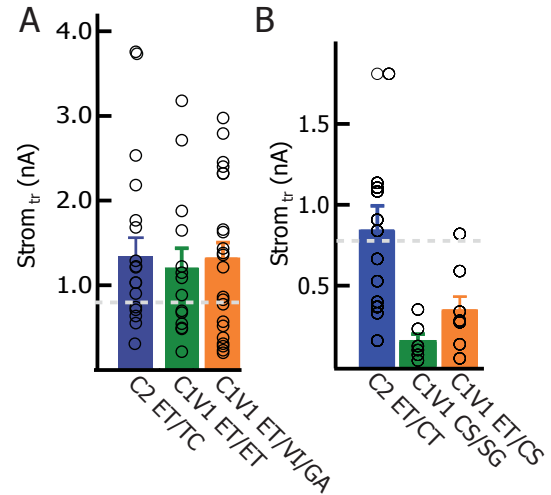
ursächlich sein kann [46]. Die Kombination beider Mutanten C1V1 E122T/E162T beschleunigt den τ_{Abk} auf 54 ms und schmälert das Aktionsspektrum auf eine für Rhodopsin typische Halbwertsbreite von ~ 90 nm. Da sich die beiden Eigenschaften der Einzelmutanten ohne synergistische Effekte kombinieren lassen, scheinen beide Glu funktionell unabhängig voneinander zu sein. Mutanten wie beispielsweise E122T oder auch die Kombination E122T/E162T zeigen in der C1V1-B Variante gleiche Effekte wie in der C1V1-A Variante. Wie Abbildung 5.5 **B** zeigt, ist das Verhältnis der Stromamplituden bei 542 nm / 630 nm auch in der C1V1-B E122T Variante größer als bei C1V1-B E122T/E162T und auch die beschleunigte Abklingkinetik für die Doppelmutante stimmt mit den hier vorgestellten Werten der C1V1-A Variante überein (Vergleiche Abbildung 5.5 **B** und Tabelle 4.2). Da sich die Sequenzunterschiede zwischen C1V1-A und C1V1-B zum größten Teil in der extrazellulären Schleife befinden, sind wohl die Mutationen und ihre Auswirkung auf C1V1-A direkt auf C1V1-B übertragbar. Die Kombination von C1V1 E122T mit der Doppelmutante C1V1 V196I/G197A führt zu der Trippelmutante C1V1 E122T/V196I/G197A mit einer beschleunigten Kinetik und einer langwelligen Absorption (τ_{Abk} 62 ms und λ_{max} 544 nm). Die Doppelmutante C1V1 V196I/G197A liegt in einem funktionell interessanten Sequenzabschnitt zwischen den bereits charakterisierten Positionen C2 D156 (C1V1 D195) und C2 T159 (C1V1 C198) (siehe Abbildung 5.7) [52, 109].

Wie Abbildung 5.7 zeigt, sind beide As aus Helix D nach außen gerichtet und

interagieren somit mit der Helix C vom Dimerisierungspartner. Es kann spekuliert werden, dass durch die Mutationen die Hydrophobizität erhöht und somit die Affinität der Monomere zueinander verstärkt wird. Die beschleunigte Kinetik könnte aus diesem globalen Stabilitätsgewinn resultieren. Auch könnte die beschleunigte Kinetik durch eine geringe Umorientierung der benachbarten As D195 beziehungsweise T198 begründet sein (siehe Abbildung 5.7).

Die SFR Mutante C1V1 C167S verlangsamt den τ_{Abk} lediglich um das ~ 50 fache. Dagegen führt die homologe Mutation in C2 zu einer 10 000 fachen Verlangsamung. Die Kristallstruktur verdeutlicht eine Orientierung des C167 zum π -Elektronensystem des Retinals. Ein Protonierungsgeflecht zwischen C167 und D195 wie von Nack *et al.* postuliert ist aufgrund der Distanz von 4.4 Å eher unwahrscheinlich [112]. Die Verlangsamung der Abklingkinetik durch C167S ist wohl auf eine veränderte Interaktion zum π -Elektronensystem des Retinals zurückzuführen, die eine Reisoimerisierung verzögert. Eine spektroskopische Untersuchung demonstrierte, dass sich in aktivierten SFRs der Photozyklus verzweigt und ein Retroretinal ausgebildet wird [114]. Diese Beobachtung könnte dadurch erklärt sein, dass die Energiebarriere für die Reisoimerisierung in diesen Mutanten stark erhöht ist und Seitenreaktionen eingegangen werden. Da die Mutation C1V1 C198T nochmals den bereits verlangsamten Photozyklus von C1V1 C167S um den Faktor 2 auf 9 s verlangsamt, ist auch ein Einfluss von C198 auf das π -Elektronensystem vom Retinal wahrscheinlich. Der Abstand zwischen C198 und dem Retinal beträgt 2 Å. Die Funktion von D195 ist wahrscheinlich nicht die Protonierung, sondern sie dient der Positionierung von C167 und C198. Durch die zweite SFR Mutation, C2 D156A (C1V1 D195), wird diese Positionierungsstütze entfernt und die Interaktion der Cys mit den π -Elektronen des Retinals verhindert. Somit liegt es nahe, dass die Verlangsamung des Photozyklus bei D156A von $\geq 10\,000$ auf einen indirekten Effekt über C128 beruht [109]. Die Doppelmutation C128S/D156A besitzt einen elektrophysiologischen τ_{Abk} von $\sim 30\,min$, was auf einen synergistischen Effekt hinweist [150].

Abbildung 5.8: Stellt die Photostromamplituden der beschleunigten und verlangsamen Farbmanten zusammen. In **A** sind die Photostromamplituden der beschleunigten Mutanten gezeigt: C2 E123T/T159C ($\tau_{Abk,ima}$ 11 ms), C1V1 E122T/E162T ($\tau_{Abk,ima}$ 15 ms) und C1V1 E122T/V196I/G197A ($\tau_{Abk,ima}$ 41 ms). **B** zeigt die Photostromamplituden von C2 E123T/C128T ($\tau_{Abk,ima}$ 0.9 s), C1V1 C167S/S220G (τ_{Abk} 6.6 s) und C1V1 E122T/C167S (τ_{Abk} 5.8 s). Die jeweiligen Mutanten wurden unter Standardbedingungen in HEK Zellen gemessen und bei ihrer jeweiligen maximalen Absorption (490, 520, 560 nm) angeregt. Die gestrichelte Linie entspricht dem Photostrom von C2 wt.



Durch gezielte Mutationen in den ChR Varianten mit rotverschobenen Aktionsspektrum konnten neue optogenetische Werkzeuge generiert werden, die eine höhere Photostromamplitude in HEK Zellen besitzen als die bisher häufig genutzten blauen ChR Varianten C2 wt und C2 H134R (siehe Abbildung 5.8). Insbesondere C1V1 E122T/E162T ist aufgrund der schnellen Abklingkinetik ein gutes Werkzeug für schnelle Aktivierung von Neuronen [150]. Zum kurzen, nicht hochfrequenten Aktivieren von Neuronen, in denen zum Beispiel wellenlängenabhängig bestimmte Neuronenpopulationen angeregt werden sollen, eignet sich C1V1 E122T/V196I/G197A mit seinem nur moderat beschleunigten $\tau_{Abk,ima}$ von 41 ms besonders.

Bei den farbverschobenen SFRs fällt der geringe Photostrom von C1V1 C167S/S220G und C1V1 E122T/C167S auf. Im Vergleich dazu zeigt die 490 nm Variante (C2 E123T/C128T) einen höheren Photostrom als das C2. Die beiden C1V1 basierten SFRs besitzen einen deutlich geringeren Photostrom als C2, obwohl weiterhin eine hohe Membranexpression vorliegt (*nicht gezeigt*). Um dieses Phänomen besser zu verstehen, müssen die einzelnen Photozyklusintermediate interpretiert werden. Da es bisher noch nicht gelungen ist, C1V1 aufzureinigen und somit der Spektroskopie zugänglich zu machen, wird der Photozyklus von V1 zur Betrachtung herangezogen (siehe Abbildung 5.9 A) [13]. Beide potentiell leitenden Zustände P390 und P520 können photochemisch

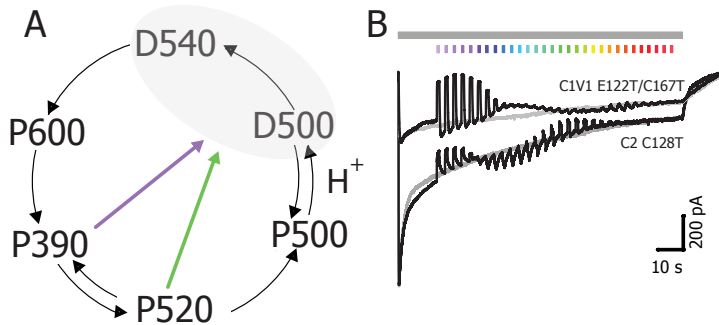


Abbildung 5.9: A Illustriert den spektroskopischen Photozyklus von V1 [13]. B zeigt elektrophysiologische Stromspuren von C2 C128T (blau) und C1V1 E122T/C167S (orange), in denen Lichtblitze von 350 – 650 nm alle 10 nm für je 1 s appliziert wurden (aufgenommen von J. Wietek, wellenlängenabhängige Lichtintensitäten wurden über einen automatisch betriebenen Gradientenfilter auf eine Intensität korrigiert).

mit den jeweiligen Wellenlängen in die beiden Dunkelzustände zurückreagieren. Durch die verzögerte Reiserisierung ist die Verweildauer der aktivierten SFRs in den Offenzuständen groß und damit steigt auch die Wahrscheinlichkeit, durch die Absorption eines zweiten Photons mit der richtigen Wellenlänge direkt in den Dunkelzustand zu reagieren. Im Falle der längerwelligen C1V1 basierten SFRs, deren Aktionsspektrum stärker mit dem P520 Spektrum überlappt, wird bei einer 300 ms Belichtung mit Anregungswellenlänge von 520 beziehungsweise 560 nm auch die photochemische Rückreaktion induziert, was wohl den geringen Photostrom erklärt. Mittels *elektrophysiologischer Spektroskopie* wurden Lichtpulse (1 s) verschiedener Wellenlängen auf bereits aktiviertes C2 C128T beziehungsweise C1V1 E122T/C167S appliziert, um diese Hypothese zu testen (siehe Abbildung 5.9 B). Im Falle von C2 C128T wird die photochemische Rückreaktion bei 390 nm beziehungsweise bei ungefähr 520 nm am stärksten, da das Anregungs-/Aktionsspektrum genau zwischen P390 und P520 liegt. Bei C1V1 E122T/C167S wird die photochemische Rückreaktion bei 390 nm am stärksten induziert, weil sich das Aktionsspektrum durch die Rotverschiebung weniger stark mit dem P390 überlappt, aber dafür nun um so mehr mit P520. Anhand dieses Experimentes konnte gezeigt werden, dass sich in den C1V1 Varianten zwar das Aktionsspektrum längerwellig gegenüber C2 Varianten verschoben hat, aber die Absorption der Intermediate sich nicht im gleichen Maße verändert. Dadurch überlappen

im Falle der C1V1 basierten SFRs die Aktionsspektren stärker mit dem Spektrum von P520, was dann zu kleineren Photoströmen führt.

Zusammenfassend sind in Abbildung 5.10 die Einzelschritte der Entwicklung von den nativen ChRs zu den farblich- und kinetisch optimierten ChRs für die optogenetische Forschung dargestellt. Der hierfür entscheidende Schritt war die in dieser Arbeit vorgestellte Entwicklung der gut exprimierenden, rotverschobenen C1V1 Chimäre. Eine anschließende Mutationsstudie erlaubte es, die spektrale Palette der optogenetisch anwendbaren ChRs über die 500 nm Grenze hinaus zu erweitern.

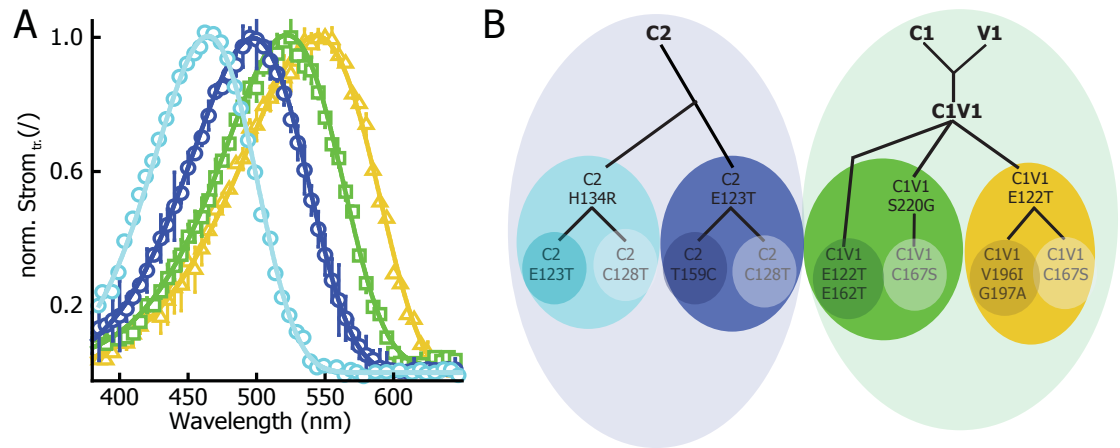


Abbildung 5.10: Die verschiedenen Aktionsspektren der C2 (*hellblau*), C2 E123T/T159C (*hellblau*), C1V1 S220G (*grün*) und C1V1 E122T (*orange*) sind in **A** gezeigt. In **B** ist die Entwicklung der verschiedenen absorbierenden ChRs gezeigt. Für die jeweilige Farbvariante wurde eine schnelle (*dunkel eingekreist*) und eine langsame Variante (*hell eingekreist*) entwickelt. In dieser Arbeit wurden alle grün und orange absorbierende Varianten konzipiert und generiert.

5.7 Lichtabhängige Aktivierung und Detektion von Kalziumeinströmen

In den Voruntersuchungen mit Fura-2 konnte gezeigt werden, dass eine prinzipielle Depolarisierung der HEK Zellen mit C2 möglich ist und die Aktivität von $Ca_v3.2$ mittels des eingeströmten Ca^{2+} detektiert werden kann (siehe Abbildung 4.17) [155].

Um ein Öffnen von $Ca_V3.2$ bereits beim Anregen von Fura-2 zu verhindern, musste mit Lichtintensitäten von $\sim 0.5 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ gearbeitet werden. Da $Ca_V3.2$ nach dem transienten Öffnen deaktiviert blieb, musste das Membranpotential durch den mTrek Kaliumkanal mittels der extrazellulären K^+ Konzentration auf $\leq -70 \text{ mV}$ eingestellt werden. Die kalziumabhängigen, lichtinduzierten Signale der Fura-2 Fluoreszenz bilden aufgrund der langsamen Erholungskinetik nicht die intrinsische Kinetik des Kalziumkanals ab. Die mTrek Zelllinie kann als Testsystem für das Zusammenspiel einer von ChR-vermittelten Aktivierung von Kalziumkanälen mit optischen Sensoren zur Detektion der Aktivität verstanden werden. Da, wie in der Einleitung bereits erwähnt, in Neuronen jedes AP kurzzeitig die intrazelluläre Ca^{2+} Konzentration ansteigen lässt, kann die hier vorgestellte Kombination auch als Modellsystem zum Testen des Zusammenspiels von ChR mit genetisch-kodierten optischen Indikatoren verstanden werden.

Durch das rotverschobene Aktionsspektrum von C1V1 und der damit verbundenen geringeren Absorption im Blauen konnte die Exzitationsintensität vom Fura-2 auf $\sim 2 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ erhöht werden. Durch die erhöhte Exzitationsintensität waren die Fluoreszenzsignale bei 510 nm ausreichend hoch, um das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten bei einer 340 und 380 nm Anregung zu berechnen. Das C1V1 basierte $Ca_V3.2$ Aktivitätsassay erlaubt somit auch, quantitativ den Kalziumeinstrom zu bestimmen. Der $Ca_V3.2$ Aktivitätstest kann aber nur als robustes, schnelles Voruntersuchungssystem für größere Substanzbibliotheken genutzt werden, da falsch-positive Ergebnisse durch eine mögliche Inhibition von ChR beziehungsweise mTrek auftreten können.

Der Vergleich der beiden genetisch-kodierten blauen Farbstoffe Cameleon und GCaMP3 in dem mTrek Zellsystem bestätigt die höhere Sensitivität für GCaMP3 im Vergleich zu Cameleon [84]. Die Messung des ChR-induzierten Kalziumeinstromes mittels blauer Kalziumsensoren war nur möglich durch die Entwicklung des rotverschobenden C1V1 und der damit verbundenen geringeren blauen Absorption möglich. Trotz des großen Potentials eines funktionellen, komplett genetisch-kodierten und optischen Paares

von Stimulator und Sensor ist das Problem des relativ schlechten Signal-Rausch-Verhältnisses aufgrund der geringen Fluoreszenzanregungsintensität wegen einer möglichen Ko-Aktivierung vom ChR weiterhin gegeben. Der noch unveröffentlichte Sensor RCaMP1.1017 überwindet dieses Problem. In Abbildung 4.20 **A** und **B** wird gezeigt, dass die Überlappung der Spektren sehr gering ist und der Stimulator C2 T159C und der Sensor RCaMP1.1017 mit hohen Lichtintensitäten angeregt werden können. Das führt zu einem besseren Signal-Rausch-Verhältnis des Fluoreszenzsignales. Trotz der guten Expression ist die Sensitivität vom RCaMP1.107 noch nicht vergleichbar mit GCaMP3 (persönliche Kommunikation J.Akerboom). Das hier erstmalig vorgestellte und ausbaufähige optogenetische Sensor/Stimulatorpaar C2 TC/RCaMP1.107 wird perspektivisch einen großen Anwendungsbereich in der optogenetischen Forschung finden.

6 Anhang

A Anhang

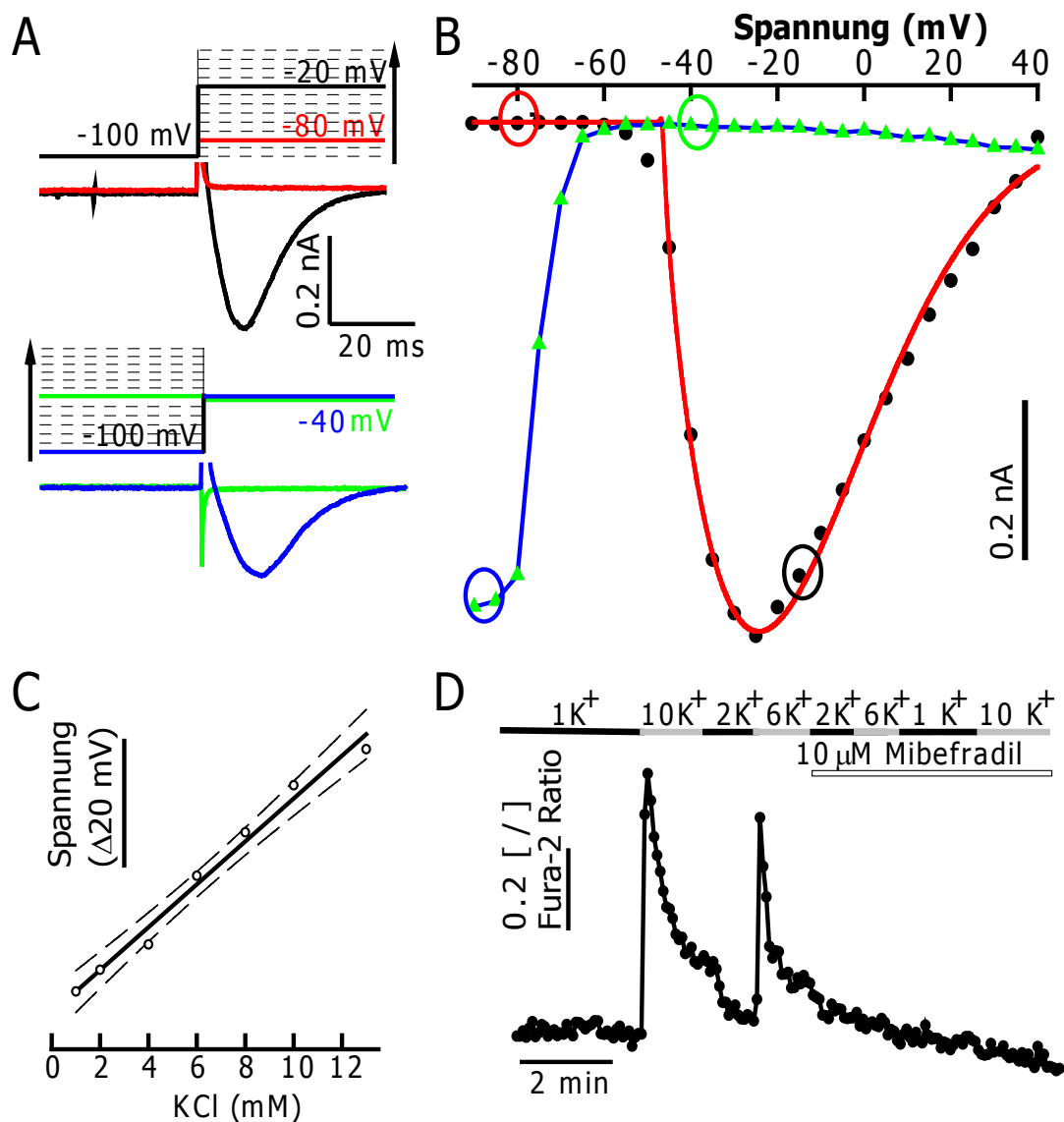


Abbildung A.1: Validieren der mTrek Zelllinie hinsichtlich ihrer elektrophysiologischen Parameter. Im oberen Ausschnitt von **A** ist das verwendete Spannungsprotokoll gezeigt. Für die *schwarzen* und *rote* markierten Spannungssprünge sind auch die entsprechenden Stromantworten gezeigt. Basierend auf diesem Spannungsprotokoll und den entsprechenden Stromantworten wurde die *rot-schwarze* Linie in **B** aufgebaut. Sie stellt das Aktivierungsprofil des spannungsabhängigen Kalziumskanals $Ca_V3.2$ da. Mit dem Protokoll und den dazugehörigen beispielhaft gezeigten Stromspuren im unteren Abschnitt von **A**, wurde die *blau-grüne* Linie in **B** generiert. Da $Ca_V3.2$ nach dem Öffnen in einen inaktivierbaren Zustand übergeht, der sich dann wiederum nur durch Spannung in einen potentiell aktivierbaren Zustand wieder überführen lässt, stellt die grün-blaue Linie eine Reaktivierungskennlinie für $Ca_V3.2$ da. In **C** ist die Abhängigkeit des Membranpotentials von der extrazellulären K^+ -Konzentration gezeigt. Diese deutliche Abhängigkeit lässt sich auf den stabile exprimierten, latent geöffneten Kaliumkanal mTrek zurückführen. Der zeitliche Verlauf des Fluoreszenzverhältnis $R_{340/380}$ für Fura-2 beladenen mTrek Zellen ist in **D** gezeigt. Durch die Veränderung der extrazellulären K^+ -Konzentration und dem damit verbundenen ändern des Membranpotentials öffnet sich $Ca_V3.2$ und Ca^{2+} fließt in die Zelle. Der zeitweilige, sprunghafte Anstieg von $R_{340/380}$ ist auf diesen Einstrom zurückzuführen.

	<i>NaCl</i>	<i>KCl</i>	<i>CaCl₂</i>	<i>MgCl₂</i>	<i>Hepes</i>	<i>C₆H₈O₇</i>	<i>C₆H₅O₇Na₃</i>	<i>Tris</i>	<i>EGTA</i>	<i>BABTA</i>	<i>NMG</i>
<i>ez Na⁺ 5.0</i>	125	1	2	2	0	5	5	0	0	0	0
<i>ez Na⁺ 7.2</i>	140	1	2	2	10	0	0	0	0	0	0
<i>ez Na⁺ 9.0</i>	140	1	2	2	0	0	0	10	0	0	0
<i>ez K⁺ 5.0</i>	0	140	2	2	0	5	5	0	0	0	0
<i>ez Ca²⁺ 5.0</i>	0	0	70	2	10	0	0	0	0	0	0
<i>ez NMG 5.0</i>	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	140
<i>ez K⁺ 7.2</i>	0	140	2	2	10	0	0	0	0	0	0
<i>ez Ca²⁺ 7.2</i>	0	0	70	2	10	0	0	0	0	0	0
<i>ez NMG 7.2</i>	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	140
<i>ez K⁺ 9.0</i>	0	140	2	2	0	0	0	10	0	0	0
<i>ez Ca²⁺ 9.0</i>	0	0	70	2	0	0	0	10	0	0	0
<i>ez NMG 9.0</i>	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	140
<i>iz Std 7.5</i>	110	1	2	2	10	0	0	0	10	0	0
<i>iz NMG 5.2</i>	0	1	2	2	0	5	5	0	10	0	110
<i>iz NMG 7.5</i>	0	1	2	2	10	0	0	0	10	0	110
<i>iz NMG 9.2</i>	0	1	2	2	0	0	0	10	10	0	110
<i>K⁺ gn2 7.2</i>	140	1	2	2	10	0	0	0	0	0	0
<i>K⁺ n2 7.2</i>	140	2	2	2	10	0	0	0	0	0	0
<i>K⁺ n5 7.2</i>	140	2	5	2	10	0	0	0	0	0	0
<i>K⁺ n10 7.2</i>	140	2	10	2	10	0	0	0	0	0	0
<i>K⁺ h 7.2</i>	140	10	2	2	10	0	0	0	0	0	0
<i>Chlamy 6.8</i>	0	0.1	0.2	0	5	0	0	0	0	0.01	10
<i>Chlamy 4.0</i>	0	0.1	0.2	0	5	0	0	0	0	0.01	10

Tabelle A.1: Zusammensetzung der in der Arbeit verwendeten Puffer. Wobei *iz* für intrazellulär und *ez* für extrazellulär steht. Die Kaliumpuffer (*gn2* ganz niedrig mit 2 *mM* CaCl₂, *n2* niedrig mit 2 *mM* CaCl₂, *n5* niedrig mit 5 *mM* CaCl₂, *n10* niedrig mit 10 *mM* CaCl₂ und *h* hoch mit 2 *mM* CaCl₂) fanden Verwendung für die Fluoreszenzmessungen mit ionen-sensitiven Farbstoffen. Die Osmolarität alle Puffer wurde mit Glukose auf 280 *mOsm* für intrazelluläre bzw. 320 *mOsm* für extrazelluläre Puffer eingestellt.

ChR Variante	λ_{max} (nm)	I_{Spitze} (nA)	Inaktivierung (%)	τ_{Abk} (ms)	$\tau_{Abk,ima}$ (ms)	τ_{Iak} (ms)	$\tau_{Erk,-60mV}$ (s)
C2	465±2	-0.8±0.04	72±16	21±2	8.4±0.3	65±9	6±0.2
C1	478±2	-0.2±0.16	32±6	23±2	11.2±0.7	58±30	17±0.2
V1	488±6/546±1	-0.3±0.02	38±8	77±8	22.7±4.7	206±61	28±0.8
C1V1	539±4	-1.3±0.3	36±3	130±17	77±8	192±20	4±0.3
C2 H134R	461±1	-0.5± 31±2	31±2	26±3	19.7±0.8	63±9	6±0.6
C2 T159C	463±1	-2.3±0.43	60±1	62±2	27.1±0.5	166±9	4±0.5
C2 L132C							
C2 C128T	465±6	-0.8±0.15	n.b.	1345±143	1520±81	n.b.	n.b.
C2 E123T/C128T	465±7	-0.8± 0.12	n.b.	2471±800	927±71	n.b.	n.b.
C2 L132C/T159C							
C2 E123T/T159C	492±2	-1.4±0.03	31±2	50±3	10.8±0.81	75±10	4±0.1
C1V1 S220G	526±1	-1.6±0.41	122±14	17±1	182±20	12±2	
C1V1 E122T	547±2	-1.0±0.35	38±3	157±24	73±4	404±59	
C1V1 E122T/E162T	528±2	-1.1±0.08	27±2	42±1	15±1	184±9	11±0.2
C1V1 C167S/S220G	528±4	-0.3±0.06	n.b.	4683±1165	6670±3500	n.b.	n.b.
C1V1 E122T/C167S	537±5	-0.4±0.06	n.b.	4236±1779	5800±2600	n.b.	n.b.
C1V1 E122T/V196I/G197A	544±1	-1.3±0.21	68±17	62±3	41±3	281±28	8±0.2

Tabelle A.2: Listen kinetische Parameter, Spitzenphotostrom und Inaktivierung der herausragendsten Mutantenkombinationen auf. Alle Messungen wurden bei bei pH_o 7.2 und pH_i 7.5 und einer Membranspannung - 60 mV bestimmt. Mit Ausnahme der immanenten Abklingkinetik ($\tau_{Abk,ima}$) die in Oozyten bestimmt wurden, stammen alle aufgenommenen Werte aus HEK Zellenmessungen.

Literaturverzeichnis

- [1] F. H. Treichler. Reinforcer preference effects on probability learning by monkeys. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 64:339–342, 1967.
- [2] Peter Hegemann. Algal sensory photoreceptors. *Annu Rev Plant Biol*, 59:167–189, 2008.
- [3] Peter W. Atkins and Julio De Paula. *Physikalische Chemie*. Wiley-VCH, Weinheim, 2008.
- [4] John L. Spudich and Kwang-Hwan Jung. *Handbook of Photosensory Receptors*. Wiley-VCH, 2005.
- [5] Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, and Lubert Stryer. *Biochemie*. Spektrum, München ; Heidelberg, 2007.
- [6] Ghazaleh Nematollahi, Arash Kianianmomeni, and Armin Hallmann. Quantitative analysis of cell-type specific gene expression in the green alga volvox carteri. *BMC Genomics*, 7:321, 2006.
- [7] Hartmann Harz. *Lichtinduzierte Ionenströme in Chlamydomonas reinhardtii*. PhD thesis, Ludwig-Maximilians-Universität München, 1992.
- [8] M. Melkonian and H. Robeneck. The eyespot apparatus of flagellated green algae: a critical review. *Progr. Phycol. Res.*, 3:193–286, 1984.
- [9] J.J. Hoops. Motility in the colonial and multicellular volvocales: structure, function and evolution. *Protoplasma*, 199:99 – 112, 1997.

- [10] Noriko Ueki, Shigeru Matsunaga, Isao Inouye, and Armin Hallmann. How 5000 independent rowers coordinate their strokes in order to row into the sunlight: phototaxis in the multicellular green alga volvox. *BMC Biol*, 8:103, 2010.
- [11] Franz-Josef Braun. *Untersuchungen von Photorezeptorströmen und intrazellulären Ionenkonzentrationen in Chlamydomonas reinhardtii und Volvox carteri*. PhD thesis, Universität Regensburg, 1997.
- [12] K.W. Foster and Smyth R.D. Light antennas in phototactic algae. *Microbiol. Rev.*, 44:572–630, 1980.
- [13] Arash Kianianmomeni, Katja Stehfest, Ghazaleh Nematollahi, Peter Hegemann, and Armin Hallmann. Channelrhodopsins of volvox carteri are photochromic proteins that are specifically expressed in somatic cells under control of light, temperature, and the sex inducer. *Plant Physiol*, 151(1):347–366, 2009.
- [14] Brian Y Chow, Xue Han, Allison S Dobry, Xiaofeng Qian, Amy S Chuong, Mingjie Li, Michael A Henninger, Gabriel M Belfort, Yingxi Lin, Patrick E Monahan, and Edward S Boyden. High-performance genetically targetable optical neural silencing by light-driven proton pumps. *Nature*, 463(7277):98–102, 2010.
- [15] A. Dereeper, V. Guignon, G. Blanc, S. Audic, S. Buffet, F. Chevenet, J-F. Dufayard, S. Guindon, V. Lefort, M. Lescot, J-M. Claverie, and O. Gascuel. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res*, 36(Web Server issue):W465–W469, 2008.
- [16] Masato Kumauchi and Thomas Ebrey. *Handbook of Photosensory Receptors*. Wiley-VCH, 2005.
- [17] Akihisa Terakita. The opsins. *Genome Biol*, 6(3):213, 2005.
- [18] Adrian K Sharma, John L Spudich, and W. Ford Doolittle. Microbial rhodopsins: functional versatility and genetic mobility. *Trends Microbiol*, 14(11):463–469, 2006.

- [19] Georg Nagel, Doris Ollig, Markus Fuhrmann, Suneel Kateriya, Anna Maria Musti, Ernst Bamberg, and Peter Hegemann. Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae. *Science*, 296(5577):2395–2398, 2002.
- [20] Georg Nagel, Tanjef Szellas, Wolfram Huhn, Suneel Kateriya, Nona Adeishvili, Peter Berthold, Doris Ollig, Peter Hegemann, and Ernst Bamberg. Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(24):13940–13945, 2003.
- [21] Oleg A Sineshchekov, Kwang-Hwan Jung, and John L Spudich. Two rhodopsins mediate phototaxis to low- and high-intensity light in *chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(13):8689–8694, 2002.
- [22] Takeshi Suzuki, Kenta Yamasaki, Satoshi Fujita, Kazushi Oda, Mineo Iseki, Kazuichi Yoshida, Masakatsu Watanabe, Hiromi Daiyasu, Hiroyuki Toh, Eriko Asamizu, Satoshi Tabata, Kenji Miura, Hideya Fukuzawa, Shogo Nakamura, and Tetsuo Takahashi. Archaeal-type rhodopsins in *chlamydomonas*: model structure and intracellular localization. *Biochem Biophys Res Commun*, 301(3):711–717, 2003.
- [23] G. Nagel, T. Szellas, S. Kateriya, N. Adeishvili, P. Hegemann, and E. Bamberg. Channelrhodopsins: directly light-gated cation channels. *Biochem Soc Trans*, 33(Pt 4):863–866, 2005.
- [24] M. T. Facciotti, S. Rouhani, F. T. Burkard, F. M. Betancourt, K. H. Downing, R. B. Rose, G. McDermott, and R. M. Glaeser. Structure of an early intermediate in the m-state phase of the bacteriorhodopsin photocycle. *Biophys J*, 81(6):3442–3455, 2001.
- [25] Hideaki E Kato, Feng Zhang, Ofer Yizhar, Charu Ramakrishnan, Tomohiro Nishizawa, Kunio Hirata, Jumpei Ito, Yusuke Aita, Tomoya Tsukazaki, Shigehiko Hayashi, Peter Hegemann, Andrés D Maturana, Ryuichiro Ishitani, Karl

- Deisseroth, and Osamu Nureki. Crystal structure of the channelrhodopsin light-gated cation channel. *Nature*, Jan 2012.
- [26] Ming Zhang, Brian Gaschen, Wendy Blay, Brian Foley, Nancy Haigwood, Carla Kuiken, and Bette Korber. Tracking global patterns of n-linked glycosylation site variation in highly variable viral glycoproteins: Hiv, siv, and hcv envelopes and influenza hemagglutinin. *Glycobiology*, 14(12):1229–1246, 2004.
- [27] Karin Julenius, Anne Mølgaard, Ramneek Gupta, and Søren Brunak. Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type o-glycosylation sites. *Glycobiology*, 15(2):153–164, 2005.
- [28] Konstantin Nikolic, Nir Grossman, Matthew S Grubb, Juan Burrone, Chris Toumazou, and Patrick Degenaar. Photocycles of channelrhodopsin-2. *Photochem Photobiol*, 85(1):400–411, 2009.
- [29] Janos K Lanyi. Bacteriorhodopsin. *Annu Rev Physiol*, 66:665–688, 2004.
- [30] Christian Bamann, Taryn Kirsch, Georg Nagel, and Ernst Bamberg. Spectral characteristics of the photocycle of channelrhodopsin-2 and its implication for channel function. *J Mol Biol*, 375(3):686–694, 2008.
- [31] Oliver P Ernst, Pedro A Sanchez Murcia, Peter Daldrop, Satoshi P Tsunoda, Suneel Kateriya, and Peter Hegemann. Photoactivation of channelrhodopsin. *J Biol Chem*, 283(3):1637–1643, 2008.
- [32] Eglof Ritter, Katja Stehfest, Andre Berndt, Peter Hegemann, and Franz J Bartl. Monitoring light-induced structural changes of channelrhodopsin-2 by uv-visible and fourier transform infrared spectroscopy. *J Biol Chem*, 283(50):35033–35041, 2008.
- [33] Ionela Radu, Christian Bamann, Melanie Nack, Georg Nagel, Ernst Bamberg, and Joachim Heberle. Conformational changes of channelrhodopsin-2. *J Am Chem Soc*, 131(21):7313–7319, 2009.

- [34] Katrin Feldbauer, Dirk Zimmermann, Verena Pintschovius, Julia Spitz, Christian Bamann, and Ernst Bamberg. Channelrhodopsin-2 is a leaky proton pump. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(30):12317–12322, 2009.
- [35] P. Hegemann, W. Gärtner, and R. Uhl. All-trans retinal constitutes the functional chromophore in chlamydomonas rhodopsin. *Biophys J*, 60(6):1477–1489, 1991.
- [36] J. Nathans. Determinants of visual pigment absorbance: identification of the retinylidene schiff’s base counterion in bovine rhodopsin. *Biochemistry*, 29(41):9746–9752, 1990.
- [37] Ernesto Salcedo, Lijun Zheng, Meridee Phistry, Eve E Bagg, and Steven G Britt. Molecular basis for ultraviolet vision in invertebrates. *J Neurosci*, 23(34):10873–10878, 2003.
- [38] Edda Kloppmann, Torsten Becker, and G. Matthias Ullmann. Electrostatic potential at the retinal of three archaeal rhodopsins: implications for their different absorption spectra. *Proteins*, 61(4):953–965, 2005.
- [39] Shigehiko Hayashi, Emad Tajkhorshid, Eva Pebay-Peyroula, Antoine Royant, Ehud M. Landau, Javier Navarro, and Klaus Schulten. Structural determinants of spectral tuning in retinal proteins bacteriorhodopsin vs sensory rhodopsin ii. *The Journal of Physical Chemistry B*, 105(41):10124–10131, 2001.
- [40] L. Ren, C. H. Martin, K. J. Wise, N. B. Gillespie, H. Luecke, J. K. Lanyi, J. L. Spudich, and R. R. Birge. Molecular mechanism of spectral tuning in sensory rhodopsin ii. *Biochemistry*, 40(46):13906–13914, 2001.
- [41] Michael Hoffmann, Marius Wanko, Paul Strodel, Peter H König, Thomas Frauenheim, Klaus Schulten, Walter Thiel, Emad Tajkhorshid, and Marcus Elstner. Color tuning in rhodopsins: the mechanism for the spectral shift between bacteriorhodopsin and sensory rhodopsin ii. *J Am Chem Soc*, 128(33):10808–10818, 2006.

- [42] A. Losi, S. E. Braslavsky, W. Gärtner, and J. L. Spudich. Time-resolved absorption and photothermal measurements with sensory rhodopsin i from halobacterium salinarum. *Biophys J*, 76(4):2183–2191, 1999.
- [43] J. L. Spudich and R. A. Bogomolni. Spectroscopic discrimination of the three rhodopsinlike pigments in halobacterium halobium membranes. *Biophys J*, 43(2):243–246, 1983.
- [44] Thorsten Fischer and Norbert A Hampp. Two-photon absorption of bacteriorhodopsin: formation of a red-shifted thermally stable photoproduct f620. *Biophys J*, 89(2):1175–1182, 2005.
- [45] Lutz Vogeley, Oleg A Sineshchekov, Vishwa D Trivedi, Jun Sasaki, John L Spudich, and Hartmut Luecke. Anabaena sensory rhodopsin: a photochromic color sensor at 2.0 a. *Science*, 306(5700):1390–1393, 2004.
- [46] Satoshi P Tsunoda and Peter Hegemann. Glu 87 of channelrhodopsin-1 causes ph-dependent color tuning and fast photocurrent inactivation. *Photochem Photobiol*, 85(2):564–569, 2009.
- [47] C. Nonnengaesser, E. M. Holland, H. Harz, and P. Hegemann. The nature of rhodopsin-triggered photocurrents in chlamydomonas. ii. influence of monovalent ions. *Biophys J*, 70(2):932–938, 1996.
- [48] Konstantin Nikolic, Patrick Degenaar, and Chris Toumazou. Modeling and engineering aspects of channelrhodopsin2 system for neural photostimulation. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 1:1626–1629, 2006.
- [49] T. E. Chater, J. M. Henley, J. T. Brown, and A. D. Randall. Voltage- and temperature-dependent gating of heterologously expressed channelrhodopsin-2. *J Neurosci Methods*, 193(1):7–13, 2010.
- [50] Katja Stehfest and Peter Hegemann. Evolution of the channelrhodopsin photocycle model. *Chemphyschem*, 11(6):1120–1126, 2010.

- [51] Peter Hegemann, Sabine Ehlenbeck, and Dietrich Gradmann. Multiple photocycles of channelrhodopsin. *Biophys J*, 89(6):3911–3918, 2005.
- [52] Andre Berndt, Philipp Schoenenberger, Joanna Mattis, Kay M Tye, Karl Deisseroth, Peter Hegemann, and Thomas G Oertnerbuss. High-efficiency channelrhodopsins for fast neuronal stimulation at low light levels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(18):7595–7600, 2011.
- [53] Peter Hegemann Hartmann Harz. Rhodopsin-regulated calcium currents in chlamydomonas. *Nature*, 351:489 – 491, 1991.
- [54] E. M. Holland, F. J. Braun, C. Nonnengaesser, H. Harz, and P. Hegemann. The nature of rhodopsin-triggered photocurrents in chlamydomonas. i. kinetics and influence of divalent ions. *Biophys J*, 70(2):924–931, 1996.
- [55] Dietrich Gradmann, André Berndt, Franziska Schneider, and Peter Hegemann. Rectification of the channelrhodopsin early conductance. *Biophys J*, 101(5):1057–1068, 2011.
- [56] Yuka Sugiyama, Hongxia Wang, Takuya Hikima, Minami Sato, Jun Kuroda, Tetsuo Takahashi, Toru Ishizuka, and Hiromu Yawo. Photocurrent attenuation by a single polar-to-nonpolar point mutation of channelrhodopsin-2. *Photochem Photobiol Sci*, 8(3):328–336, 2009.
- [57] Gang Wang and William B Dunbar. An integrated, low noise patch-clamp amplifier for biological nanopore applications. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2010:2718–2721, 2010.
- [58] John Y Lin, Michael Z Lin, Paul Steinbach, and Roger Y Tsien. Characterization of engineered channelrhodopsin variants with improved properties and kinetics. *Biophys J*, 96(5):1803–1814, 2009.
- [59] Melanie Nack, Ionela Radu, Christian Bamann, Ernst Bamberg, and Joachim

- Heberle. The retinal structure of channelrhodopsin-2 assessed by resonance raman spectroscopy. *FEBS Lett*, 583(22):3676–3680, 2009.
- [60] Karl Deisseroth, Guoping Feng, Ania K Majewska, Gero Miesenböck, Alice Ting, and Mark J Schnitzer. Next-generation optical technologies for illuminating genetically targeted brain circuits. *J Neurosci*, 26(41):10380–10386, 2006.
- [61] Samarendra K Mohanty, Rainer K Reinscheid, Xiaobin Liu, Naoe Okamura, Tatiana B Krasieva, and Michael W Berns. In-depth activation of channelrhodopsin 2-sensitized excitable cells with high spatial resolution using two-photon excitation with a near-infrared laser microbeam. *Biophys J*, 95(8):3916–3926, 2008.
- [62] John Peter Rickgauer and David W Tank. Two-photon excitation of channelrhodopsin-2 at saturation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(35):15025–15030, 2009.
- [63] Bertalan K Andrasfalvy, Boris V Zemelman, Jianyong Tang, and Alipasha Vaziri. Two-photon single-cell optogenetic control of neuronal activity by sculpted light. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(26):11981–11986, 2010.
- [64] Viviana Gradinaru, Feng Zhang, Charu Ramakrishnan, Joanna Mattis, Rohit Prakash, Ilka Diester, Inbal Goshen, Kimberly R Thompson, and Karl Deisseroth. Molecular and cellular approaches for diversifying and extending optogenetics. *Cell*, 141(1):154–165, 2010.
- [65] Volker Busskamp, Jens Duebel, David Balya, Mathias Fradot, Tim James Viney, Sandra Siegert, Anna C Groner, Erik Cabuy, Valerie Forster, Mathias Seeliger, Martin Biel, Peter Humphries, Michel Paques, Saddek Mohand-Said, Didier Trono, Karl Deisseroth, Jose A Sahel, Serge Picaud, and Botond Roska. Genetic reactivation of cone photoreceptors restores visual responses in retinitis pigmentosa. *Science*, 329(5990):413–417, 2010.

- [66] Tobias Bruegmann, Daniela Malan, Michael Hesse, Thomas Beiert, Christopher J Fuegemann, Bernd K Fleischmann, and Philipp Sasse. Optogenetic control of heart muscle in vitro and in vivo. *Nat Methods*, 7(11):897–900, 2010.
- [67] Viviana Gradinaru, Murtaza Mogri, Kimberly R Thompson, Jaimie M Henderson, and Karl Deisseroth. Optical deconstruction of parkinsonian neural circuitry. *Science*, 324(5925):354–359, 2009.
- [68] Albert K Lee, Ian D Manns, Bert Sakmann, and Michael Brecht. Whole-cell recordings in freely moving rats. *Neuron*, 51(4):399–407, Aug 2006.
- [69] Elena Molokanova and Alex Savchenko. Bright future of optical assays for ion channel drug discovery. *Drug Discov Today*, 13(1-2):14–22, 2008.
- [70] Feng Zhang, Li-Ping Wang, Martin Brauner, Jana F Liewald, Kenneth Kay, Natalie Watzke, Phillip G Wood, Ernst Bamberg, Georg Nagel, Alexander Gottschalk, and Karl Deisseroth. Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature*, 446(7136):633–639, 2007.
- [71] Stephanie Szobota, Pau Gorostiza, Filippo Del Bene, Claire Wyart, Doris L Fortin, Kathleen D Kolstad, Orapim Tulyathan, Matthew Volgraf, Rika Numano, Holly L Aaron, Ethan K Scott, Richard H Kramer, John Flannery, Herwig Baier, Dirk Trauner, and Ehud Y Isacoff. Remote control of neuronal activity with a light-gated glutamate receptor. *Neuron*, 54(4):535–545, 2007.
- [72] Richard H Kramer, Doris L Fortin, and Dirk Trauner. New photochemical tools for controlling neuronal activity. *Curr Opin Neurobiol*, 19(5):544–552, 2009.
- [73] Natalia Caporale, Kathleen D Kolstad, Trevor Lee, Ivan Tochitsky, Deniz Dalkara, Dirk Trauner, Richard Kramer, Yang Dan, Ehud Y Isacoff, and John G Flannery. Liglur restores visual responses in rodent models of inherited blindness. *Mol Ther*, 19(7):1212–1219, 2011.

- [74] Christine L. Forber, Eric C. Kelusky, Nigel J. Bunce, and Michael C. Zerner. Electronic spectra of cis- and trans-azobenzenes: consequences of ortho substitution. *Journal of the American Chemical Society*, 107(21):5884–5890, 1985.
- [75] Harald Janovjak, Stephanie Szobota, Claire Wyart, Dirk Trauner, and Ehud Y Isacoff. A light-gated, potassium-selective glutamate receptor for the optical inhibition of neuronal firing. *Nat Neurosci*, 13(8):1027–1032, 2010.
- [76] Saskia Schröder-Lang, Martin Schwärzel, Reinhard Seifert, Timo Strünker, Suneel Kateriya, Jens Looser, Masakatsu Watanabe, U. Benjamin Kaupp, Peter Hegemann, and Georg Nagel. Fast manipulation of cellular camp level by light in vivo. *Nat Methods*, 4(1):39–42, Jan 2007.
- [77] Manuela Stierl, Patrick Stumpf, Daniel Udvari, Ronnie Gueta, Rolf Hagedorn, Aba Losi, Wolfgang G?rtner, Linda Petereit, Marina Efetova, Martin Schwarzel, Thomas G Oertner, Georg Nagel, and Peter Hegemann. Light modulation of cellular camp by a small bacterial photoactivated adenylyl cyclase, bpac, of the soil bacterium *beggiatoa*. *J Biol Chem*, 286(2):1181–1188, 2011.
- [78] Min-Hyung Ryu, Oleg V Moskvina, Jessica Siltberg-Liberles, and Mark Gomelsky. Natural and engineered photoactivated nucleotidyl cyclases for optogenetic applications. *J Biol Chem*, 285(53):41501–41508, 2010.
- [79] Viacheslav O Nikolaev, Moritz Bünemann, Lutz Hein, Annette Hannawacker, and Martin J Lohse. Novel single chain camp sensors for receptor-induced signal propagation. *J Biol Chem*, 279(36):37215–37218, 2004.
- [80] Michael Russwurm, Florian Mullershausen, Andreas Friebe, Ronald Jäger, Corina Russwurm, and Doris Koesling. Design of fluorescence resonance energy transfer (fret)-based cgmmp indicators: a systematic approach. *Biochem J*, 407(1):69–77, 2007.
- [81] Thomas Knöpfel, Michael Z Lin, Anselm Levskaya, Lin Tian, John Y Lin, and

- Edward S Boyden. Toward the second generation of optogenetic tools. *J Neurosci*, 30(45):14998–15004, 2010.
- [82] G. Miesenböck, D. A. De Angelis, and J. E. Rothman. Visualizing secretion and synaptic transmission with ph-sensitive green fluorescent proteins. *Nature*, 394(6689):192–195, 1998.
- [83] A. Miyawaki, O. Griesbeck, R. Heim, and R. Y. Tsien. Dynamic and quantitative ca^{2+} measurements using improved cameleons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(5):2135–2140, 1999.
- [84] Lin Tian, S. Andrew Hires, Tianyi Mao, Daniel Huber, M. Eugenia Chiappe, Sreekanth H Chalasani, Leopoldo Petreanu, Jasper Akerboom, Sean A McKinney, Eric R Schreiter, Cornelia I Bargmann, Vivek Jayaraman, Karel Svoboda, and Loren L Looger. Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved gcamp calcium indicators. *Nat Methods*, 6(12):875–881, 2009.
- [85] Peng Yuan, Manuel D Leonetti, Alexander R Pico, Yichun Hsiung, and Roderick MacKinnon. Structure of the human bk channel ca^{2+} -activation apparatus at 3.0 Å resolution. *Science*, 329(5988):182–186, 2010.
- [86] A. Miyawaki, J. Llopis, R. Heim, J. M. McCaffery, J. A. Adams, M. Ikura, and R. Y. Tsien. Fluorescent indicators for ca^{2+} based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature*, 388(6645):882–887, 1997.
- [87] J. Nakai, M. Ohkura, and K. Imoto. A high signal-to-noise $\text{ca}(2+)$ probe composed of a single green fluorescent protein. *Nat Biotechnol*, 19(2):137–141, 2001.
- [88] Tianyi Mao, Daniel H O’Connor, Volker Scheuss, Junichi Nakai, and Karel Svoboda. Characterization and subcellular targeting of gcamp-type genetically-encoded calcium indicators. *PLoS One*, 3(3):e1796, 2008.
- [89] Yongxin Zhao, Satoko Araki, Jiahui Wu, Takayuki Teramoto, Yu-Fen Chang, Masahiro Nakano, Ahmed S Abdelfattah, Manabi Fujiwara, Takeshi Ishihara,

- Takeharu Nagai, and Robert E Campbell. An expanded palette of genetically encoded Ca^{2+} indicators. *Science*, 333(6051):1888–1891, 2011.
- [90] Edward S Boyden, Feng Zhang, Ernst Bamberg, Georg Nagel, and Karl Deisseroth. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci*, 8(9):1263–1268, 2005.
- [91] Georg Nagel, Martin Brauner, Jana F Liewald, Nona Adeishvili, Ernst Bamberg, and Alexander Gottschalk. Light activation of channelrhodopsin-2 in excitable cells of *Caenorhabditis elegans* triggers rapid behavioral responses. *Curr Biol*, 15(24):2279–2284, 2005.
- [92] Wei Zhang, Wooping Ge, and Zuoren Wang. A toolbox for light control of drosophila behaviors through channelrhodopsin 2-mediated photoactivation of targeted neurons. *Eur J Neurosci*, 26(9):2405–2416, 2007.
- [93] Adam D Douglass, Sebastian Kraves, Karl Deisseroth, Alexander F Schier, and Florian Engert. Escape behavior elicited by single, channelrhodopsin-2-evoked spikes in zebrafish somatosensory neurons. *Curr Biol*, 18(15):1133–1137, 2008.
- [94] Xue Han, Xiaofeng Qian, Jacob G Bernstein, Hui-Hui Zhou, Giovanni Talei Franzesi, Patrick Stern, Roderick T Bronson, Ann M Graybiel, Robert Desimone, and Edward S Boyden. Millisecond-timescale optical control of neural dynamics in the nonhuman primate brain. *Neuron*, 62(2):191–198, 2009.
- [95] Feng Zhang, Li-Ping Wang, Edward S Boyden, and Karl Deisseroth. Channelrhodopsin-2 and optical control of excitable cells. *Nat Methods*, 3(10):785–792, 2006.
- [96] Ofer Yizhar, Lief E Fenno, Thomas J Davidson, Murtaza Mogri, and Karl Deisseroth. Optogenetics in neural systems. *Neuron*, 71(1):9–34, 2011.
- [97] Lisa A Gunaydin, Ofer Yizhar, Andre Berndt, Vikaas S Sohal, Karl Deisseroth,

and Peter Hegemann. Ultrafast optogenetic control. *Nat Neurosci*, 13(3):387–392, 2010.

- [98] John H Caldwell, Greta Ann Herin, Georg Nagel, Ernst Bamberg, Astrid Scheschonka, and Heinrich Betz. Increases in intracellular calcium triggered by channelrhodopsin-2 potentiate the response of metabotropic glutamate receptor mglur7. *J Biol Chem*, 283(36):24300–24307, 2008.
- [99] S. Q. Wang, L. S. Song, E. G. Lakatta, and H. Cheng. Ca²⁺ signalling between single l-type ca²⁺ channels and ryanodine receptors in heart cells. *Nature*, 410(6828):592–596, 2001.
- [100] Aristides B Arrenberg, Didier Y R Stainier, Herwig Baier, and Jan Huiskens. Optogenetic control of cardiac function. *Science*, 330(6006):971–974, 2010.
- [101] Hiroshi Tomita, Eriko Sugano, Hitomi Isago, and Makoto Tamai. Channelrhodopsins provide a breakthrough insight into strategies for curing blindness. *J Genet*, 88(4):409–415, 2009.
- [102] Anding Bi, Jinjuan Cui, Yu-Ping Ma, Elena Olshevskaya, Mingliang Pu, Alexander M Dizhoor, and Zhuo-Hua Pan. Ectopic expression of a microbial-type rhodopsin restores visual responses in mice with photoreceptor degeneration. *Neuron*, 50(1):23–33, 2006.
- [103] John G Flannery and Kenneth P Greenberg. Looking within for vision. *Neuron*, 50(1):1–3, 2006.
- [104] Elena Ivanova and Zhuo-Hua Pan. Evaluation of the adeno-associated virus mediated long-term expression of channelrhodopsin-2 in the mouse retina. *Mol Vis*, 15:1680–1689, 2009.
- [105] Pamela S Lagali, David Balya, Gautam B Awatramani, Thomas A Muench, Douglas S Kim, Volker Busskamp, Constance L Cepko, and Botond Roska.

Light-activated channels targeted to on bipolar cells restore visual function in retinal degeneration. *Nat Neurosci*, 11(6):667–675, 2008.

- [106] Patrick Degenaar, Nir Grossman, Muhammad Ali Memon, Juan Burrone, Martin Dawson, Emmanuel Drakakis, Mark Neil, and Konstantin Nikolic. Optobionic vision—a new genetically enhanced light on retinal prosthesis. *J Neural Eng*, 6(3):035007, 2009.
- [107] Frances Ashcroft. *Ion Channels and Disease*. Oxford University Press OCT, 1999.
- [108] Andre Berndt, Ofer Yizhar, Lisa A Gunaydin, Peter Hegemann, and Karl Deisseroth. Bi-stable neural state switches. *Nat Neurosci*, 12(2):229–234, 2009.
- [109] Christian Bamann, Ronnie Gueta, Sonja Kleinlogel, Georg Nagel, and Ernst Bamberg. Structural guidance of the photocycle of channelrhodopsin-2 by an interhelical hydrogen bond. *Biochemistry*, 49(2):267–278, 2010.
- [110] Viviana Gradinaru, Kimberly R Thompson, Feng Zhang, Murtaza Mogri, Kenneth Kay, M. Bret Schneider, and Karl Deisseroth. Targeting and readout strategies for fast optical neural control in vitro and in vivo. *J Neurosci*, 27(52):14231–14238, 2007.
- [111] Hongxia Wang, Yuka Sugiyama, Takuya Hikima, Eriko Sugano, Hiroshi Tomita, Tetsuo Takahashi, Toru Ishizuka, and Hiromu Yawo. Molecular determinants differentiating photocurrent properties of two channelrhodopsins from chlamydomonas. *J Biol Chem*, 284(9):5685–5696, 2009.
- [112] Melanie Nack, Ionela Radu, Michael Gossing, Christian Bamann, Ernst Bamberg, Gabriele Fischer von Mollard, and Joachim Heberle. The dc gate in channelrhodopsin-2: crucial hydrogen bonding interaction between c128 and d156. *Photochem Photobiol Sci*, 9(2):194–198, 2010.
- [113] Philipp Schoenenberger, Daniela Gerosa, and Thomas G Oertner. Temporal control of immediate early gene induction by light. *PLoS One*, 4(12):e8185, 2009.

- [114] Katja Stehfest, Eglof Ritter, Andre Berndt Berndt, Franz Bartl, and Peter Hegemann. The branched photocycle of the slow-cycling channelrhodopsin-2 mutant c128t. *J Mol Biol*, 398(5):690–702, 2010.
- [115] Lei Wen, Hongxia Wang, Saki Tanimoto, Ryo Egawa, Yoshiya Matsuzaka, Hajime Mushiake, Toru Ishizuka, and Hiromu Yawo. Opto-current-clamp actuation of cortical neurons using a strategically designed channelrhodopsin. *PLoS One*, 5(9):e12893, 2010.
- [116] Tilo Mathes. Photochemie und signaltransduktion von blaulich-trezeptorproteinen aus photosynthetisierenden mikroorganismen. [Online: Stand 2011-01-22T11:37:41Z].
- [117] M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, and D. C. Prasher. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263(5148):802–805, 1994.
- [118] A. Mehrotra X. Li L. E. Hughes D. Gani M. L. L. Donnellyb, G. Luke and M. D. Ryan. Analysis of the aphthovirus 2a/2b polyprotein "cleavage" mechanism indicates not a proteolytic reaction, but a novel translational effect: a putative ribosomal skip". *Journal of General Virology*, 82:1013–1025, 2001.
- [119] G. Grynkiewicz, M. Poenie, and R. Y. Tsien. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*, 260(6):3440–3450, 1985.
- [120] Junlan Yao, Lucinda A Davies, Jason D Howard, Scott K Adney, Philip J Welsby, Nancy Howell, Robert M Carey, Roger J Colbran, and Paula Q Barrett. Molecular basis for the modulation of native t-type Ca^{2+} channels in vivo by Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase ii. *J Clin Invest*, 116(9):2403–2412, 2006.
- [121] Peter Berthold, Satoshi P Tsunoda, Oliver P Ernst, Wolfgang Mages, Dietrich Gradmann, and Peter Hegemann. Channelrhodopsin-1 initiates phototaxis

- and photophobic responses in chlamydomonas by immediate light-induced depolarization. *Plant Cell*, 20(6):1665–1677, 2008.
- [122] Xuesi M. Shao and Jack L. Feldman. Micro-agar salt bridge in patch-clamp electrode holder stabilizes electrode potentials. *Journal of Neuroscience Methods*, 159(1):108 – 115, 2007.
- [123] H. Nyquist. Certain topics in telegraph transmission theory. *Trans. AIEE*, 47:617–644, 1928.
- [124] DS30 (02/04). Luxeon 5 w star, technical specification. Technical report, Lumileds, 2004.
- [125] Bernhard M Schmitt and Hermann Koepsell. An improved method for real-time monitoring of membrane capacitance in xenopus laevis oocytes. *Biophys J*, 82(3):1345–1357, 2002.
- [126] Bert Sakmann and Erwin Neher. *Single-Channel Recording*. Springer, 2nd edition, 1995.
- [127] O. P. Hamill, A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, and F. J. Sigworth. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch*, 391(2):85–100, 1981.
- [128] A. L. Hodgkin and A. F. Huxley. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol*, 117(4):500–544, 1952.
- [129] D. C. Chang. Dependence of cellular potential on ionic concentrations. data supporting a modification of the constant field equation. *Biophys J*, 43(2):149–156, 1983.
- [130] A. L. HODGKIN. Ionic movements and electrical activity in giant nerve fibres. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 148(930):1–37, 1958.

- [131] Bertil Hille. *Ionic Channels of Excitable Membranes*. Sinauer Associates, November 1991.
- [132] D. R. Davies and V. Lyall. The assembly of a highly ordered component of the cell wall: the role of heritable factors and of physical structure. *Mol Gen Genet*, 124(1):21–34, 1973.
- [133] Oleg A Sineshchekov, Elena G Govorunova, and John L Spudich. Photosensory functions of channelrhodopsins in native algal cells. *Photochem Photobiol*, 85(2):556–563, 2009.
- [134] E. M. Holland, H. Harz, R. Uhl, and P. Hegemann. Control of phobic behavioral responses by rhodopsin-induced photocurrents in chlamydomonas. *Biophys J*, 73(3):1395–1401, 1997.
- [135] Toru Ishizuka, Masaaki Kakuda, Rikita Araki, and Hiromu Yawo. Kinetic evaluation of photosensitivity in genetically engineered neurons expressing green algae light-gated channels. *Neurosci Res*, 54(2):85–94, 2006.
- [136] Feng Zhang, Matthias Prigge, Florent Beyriere, Satoshi P Tsunoda, Joanna Mattis, Ofer Yizhar, Peter Hegemann, and Karl Deisseroth. Red-shifted optogenetic excitation: a tool for fast neural control derived from volvox carteri. *Nat Neurosci*, 11(6):631–633, 2008.
- [137] Joanna Mattis, Kay M Tye, Emily A Ferenczi, Charu Ramakrishnan, Daniel J O’Shea, Rohit Prakash, Lisa A Gunaydin, Minsuk Hyun, Lief E Fenno, Viviana Gradinaru, Ofer Yizhar, and Karl Deisseroth. Principles for applying optogenetic tools derived from direct comparative analysis of microbial opsins. *Nat Methods*, 2011.
- [138] Andre Berndt, Matthias Prigge, Dietrich Gradmann, and Peter Hegemann. Two open states with progressive proton selectivities in the branched channelrhodopsin-2 photocycle. *Biophys J*, 98(5):753–761, 2010.

- [139] Franziska Schneider. Modifikationen an volvox-kanalrhodopsin 1 zur verbesserung von expression und farbverschiebung. Diplomarbeit, Humboldt Universität zu Berlin, 2009.
- [140] Satoshi P Tsunoda, David Ewers, Sabrina Gazzarrini, Anna Moroni, Dietrich Gradmann, and Peter Hegemann. H⁺-pumping rhodopsin from the marine alga acetabularia. *Biophys J*, 91(4):1471–1479, 2006.
- [141] Sonja Kleinlogel, Katrin Feldbauer, Robert E Dempski, Heike Fotis, Phillip G Wood, Christian Bamann, and Ernst Bamberg. Ultra light-sensitive and fast neuronal activation with the ca(2+)-permeable channelrhodopsin catch. *Nat Neurosci*, 14(4):513–518, 2011.
- [142] Stephen Hollingworth, Kyle R Gee, and Stephen M Baylor. Low-affinity ca²⁺ indicators compared in measurements of skeletal muscle ca²⁺ transients. *Biophys J*, 97(7):1864–1872, 2009.
- [143] Leanne Cribbs. T-type calcium channel expression and function in the diseased heart. *Channels (Austin)*, 4(6):447–452, 2010.
- [144] Anton Rösler. *Etablierung der Methode der zeitaufgelösten Fluoreszenzbildgebung zur Messung von Kalzium- und Protonen-Fluxe durch das Licht-aktivierbare Kanalrhodopsin 2*. PhD thesis, Humboldt Universität zu Berlin, 2008.
- [145] Sabine Ehlenbeck, Dietrich Gradmann, Franz-Josef Braun, and Peter Hegemann. Evidence for a light-induced (h⁺) conductance in the eye of the green alga chlamydomonas reinhardtii. *Biophys J*, 82(2):740–751, 2002.
- [146] Maria Müller, Christian Bamann, Ernst Bamberg, and Werner Kühlbrandt. Projection structure of channelrhodopsin-2 at 6 Å resolution by electron crystallography. *J Mol Biol*, 414(1):86–95, 2011.
- [147] F. J. Kühn and N. G. Greeff. Movement of voltage sensor s4 in domain 4 is tightly

- coupled to sodium channel fast inactivation and gating charge immobilization. *J Gen Physiol*, 114(2):167–183, 1999.
- [148] Xue Han and Edward S Boyden. Multiple-color optical activation, silencing, and desynchronization of neural activity, with single-spike temporal resolution. *PLoS One*, 2(3):e299, 2007.
- [149] Sing-Yi Hou, Elena G Govorunova, Maria Ntefidou, C. Elizabeth Lane, Elena N Spudich, Oleg A Sineshchekov, and John L Spudich. Diversity of chlamydomonas channelrhodopsins. *Photochem Photobiol*, 2011.
- [150] Ofer Yizhar, Lief E Fenno, Matthias Prigge, Franziska Schneider, Thomas J Davidson, Daniel J O’Shea, Vikaas S Sohal, Inbal Goshen, Joel Finkelstein, Jeanne T Paz, Katja Stehfest, Roman Fudim, Charu Ramakrishnan, John R Huguenard, Peter Hegemann, and Karl Deisseroth. Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction. *Nature*, 477(7363):171–178, 2011.
- [151] Elena G Govorunova, Elena N Spudich, C. Elizabeth Lane, Oleg A Sineshchekov, and John L Spudich. New channelrhodopsin with a red-shifted spectrum and rapid kinetics from *mesostigma viride*. *MBio*, 2(3):e00115–e00111, 2011.
- [152] Sing-Yi Hou, Elena G Govorunova, Maria Ntefidou, C. Elizabeth Lane, Elena N Spudich, Oleg A Sineshchekov, and John L Spudich. Diversity of chlamydomonas channelrhodopsins. *Photochem Photobiol*, 88(1):119–128, 2012.
- [153] D. T. Jones, W. R. Taylor, and J. M. Thornton. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput Appl Biosci*, 8(3):275–282, 1992.
- [154] B. Schobert, J. K. Lanyi, and D. Oesterhelt. Effects of anion binding on the deprotonation reactions of halorhodopsin. *J Biol Chem*, 261(6):2690–2696, 1986.
- [155] Matthias Prigge, Anton Rösler, and Peter Hegemann. Fast, repetitive

light-activation of cav3.2 using channelrhodopsin 2. *Channels (Austin)*, 4(3):241–247, 2010.

Danksagung

Mein Dank gilt Peter Hegemann, der mir Freiheit und Geduld zum Finden und Bearbeiten meiner Dissertation gewährt, mir immer beratend zur Seite stand und der in den entscheidenden Momenten durch seine Erfahrung mir und dieser Arbeit die richtigen Impulse gegeben hat.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen beiden Diplomanden – Franziska Schneider, für die fleißige und souveräne Unterstützung beim Vermessen der Mutanten und Anton Rösler, der mir wissenschaftstheoretisch gezeigt hat, was alles wichtiger ist als Wissenschaft.

Zu Dank verpflichtet bin ich unseren Kooperationspartnern Ofer Yizhar, Feng Zhang und Karl Deisseroth für das Aufzeigen der neurophysiologischen Anwendungen der Ergebnisse dieser Arbeit und auch für ihre große Diskussionsbereitschaft.

Bei Satoshi Tsunoda bedanke ich mich für die Hilfe bei molekulargenetischen Fragestellungen und die jeder Zeit gute Zusammenarbeit.

Für die Unterstützung in der Zellkultur und bei den täglichen Arbeiten im Labor bin ich Petra Klein, Gabi Reincke, Christina Morsek und besonders Maila Reh dankbar.

Bei Angela Piater bedanke ich mich für die freundliche Hilfe bei der aufreibenden HU Bürokratie.

Bedanken möchte ich mich ferner bei der AG Hermann und insbesondere bei Thomas Korte und Christian Sieben für die Bereitstellung der Messzeiten an den konfokalen Mikroskopen.

Rolf Hagedorn und Robert Arndt standen mir bei mechanischen und elektrischen Problemen mit viel Kompetenz zur Seite.

Bei Anska Laws und Günther Schmidt bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit bei den zahlreichen mechanischen Fertigungen und Aufbauten und auch für ihr Verständnis, dass ich immer Alles schon am liebsten gestern gehabt hätte.

Für das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanke ich mich bei meinen beiden oben bereits erwähnten Diplomanden und Roland Schwarzer und Jonas Wietek. Ganz besonders möchte ich mich bei Fräulein Thea Ziegler bedanken für das sehr, sehr gründliche Korrekturlesen.